

Institut für Biologie

DISSERTATION

Charakterisierung von EPB41 - Spleißformen im menschlichen Gehirn

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades Doctor rerum naturalis

(Dr. rer. nat.)

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Dipl. Biologe Carsten Jacobi
(27.11.1967)

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Dr. Ronacher

Gutachter: 1. Prof. Dr. P. M. Kloetzel
 2. Prof. Dr. T. G. Ohm
 3. Prof. Dr. A. von Deimling

eingereicht: 22.12.2000

Datum der Promotion: 22.05.2001

Zusammenfassung

In einem RT-PCR Ansatz aus neuronalen post mortem Gewebe des Menschen konnten EPB41 (Erythrozytäres Protein Bande 4.1) Spleißformen in verschiedenen Hirnregionen nachgewiesen werden. In einem weiteren RT-PCR Ansatz wurden höhermolekulare p4.1R-Spleißformen generiert, kloniert und zwei der erhaltenen Spleißformen (Klon 9 und Klon 13) charakterisiert. In einer In-situ-Hybridisierungsstudie an humanen Temporalkortex und Hippocampus konnten EPB41-Isoformen in fast allen Neuronen nachgewiesen werden. In immunhistochemischen Untersuchungen mit selbstgenerierten p4.1R spezifischen Antikörper wurden ebenfalls ausschließlich Neurone markiert. In proteinbiochemischen Untersuchungen konnte in verschiedenen humanen Hirnareale mit den p4.1R spezifischen Antikörpern eine 110 kDa und 120 kDa immunreaktive Bande nachgewiesen werden.

In Experimenten an Primärkulturen von Rattenneuronen konnte eine Herunterregulation der p4.1R Proteine sowie der mRNA von p4.1R durch Verarmung des funktionellen Pools an G-Proteinen der Rho-Familie in der Zelle gezeigt werden. Die GTPasen der Rho-Familie regulieren unter anderem die Plastizität des Dendritenbaumes von Neuronen.

Abstract

In a RT-PCR approach using human postmortem cerebral tissue from different brain regions several EPB41 (erythrocyte protein band 4.1) spliceforms could be generated. The amplicates were cloned and two of the highmolecular EPB41 spliceforms Klon 9 and Klon 13 were characterized. Klon 9 is a new spliceform, Klon13 is identical with EPB41 (accession number AF156225). In an in situ hybridization study the EPB41 spliceforms were detected in almost all neurons of the temporal cortex and the hippocampus. Immunohistochemical localization of the p4.1R immunoreactive proteins in human temporal cortex using p4.1R specific peptide antibodies, confirmed these results. The staining pattern of soma and dendrites of the neurones was punctuated. In Western Blot experiments a 110 kDa and 120 kDa p4.1R immunoreactive proteinband was detected.

A regulation of the protein 4.1R immunoreactive proteins as well as the mRNA of protein 4.1 was found in experiments in which the functional pool of Rho GTPases in hippocampal primary neurones of the rat was manipulated.

Schlagwörter:

EPB41; alternative-Spleißvorgänge; Rho GTPasen; humanes Gehirngewebe

Keywords:

EPB41, alternative splicing, Rho GTPases, human brain

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	10
1.1	Das Zytoskelett des Neurons	10
1.2	Die Protein 4.1-Superfamilie	10
1.3	Die Protein 4.1-Familie	12
1.4	Alternative Spleißvorgänge des EBP41-Gens	14
1.5	Proteindomänen von Protein 4.1R	16
1.6	Bindungspartner der Protein 4.1-Familienmitglieder	17
1.7	Funktionen der Protein 4.1-Familie	18
1.8	Neuronale Funktion von p4.1R- Proteinisoformen	20
1.9	Ziel der Arbeit	20
2	Material und Methoden	21
2.1	Standardprozeduren	21
2.2	Gewebespezifikation	21
2.3	Isolierung von Gesamt-RNA aus humanem post mortalen Gewebe	23
2.4	Reverse Transkription	23
2.5	Polymerasen-Ketten-Reaktion	23
2.5.1	Primerkombinationen für RT-PCR-Experimente	24
2.6	Sequenzierung	24
2.7	In-situ-Hybridisierung	25
2.7.1	Der Digoxigenin-Nachweis:	25
2.8	Antikörperherstellung	26
2.8.1	Herstellung von Antikörpern gegen erythrozytäres Protein 4.1	26
2.8.2	Herstellung von Protein 4.1 - Peptidantikörpern	26
2.9	Herstellung von Proteinhomogenaten aus post mortalem Gewebe für die Immunoblotanalyse	27
2.10	Immunoblot und SDS-PAGE	27
2.11	Präparation von neuronalem Rattengewebe	27
2.12	Neuronale und gliale Zellkulturen von Ratten	27
2.12.1	Neuronale Primärkultur	27
2.12.2	Primäre astrogliale Kulturen	28
2.12.3	Mikroglia Zellkulturen	28
2.12.4	Behandlung der Neuronenkultur	28
2.12.5	Probenaufbereitung der Zellkultur für die Immunoblotanalyse	29

2.13	Immunhistochemie	29
2.13.1	Immunhistochemische Analyse von humanem post mortalen Material.	29
2.13.2	Immunzytochemie an Neuronenkulturen	30
2.14	Konfokale Laserscanning-Mikroskopie	30
2.15	Semiquantitative RT-PCR	30
3	Ergebnisse	32
3.1	Untersuchung des EBP41 Gens auf Spleißvarianten im menschlichen Gehirn	32
3.2	Klonierung der Gesamtsequenz	33
3.3	In-situ-Hybridisierung mit EPB41 - Sonden	35
3.4	Immunoblotanalyse an humanem Geweben	39
3.4.1	Immunoblotanalyse mit einem Antikörper gegen die 1. Spleißstelle von Klon 9	41
3.5	Immunhistochemische Untersuchung	41
3.6	Proteinbiochemische Untersuchungen am Rattengewebe	43
3.6.1	Lokalisation der Protein 4.1-Isoformen im Neuron	45
3.7	Studien an neuronalen Rattenzellkulturen	46
3.7.1	Immunoblotanalyse	46
3.7.2	Immunzytochemische Analyse	49
3.7.3	Semiquantitative RT-PCR	50
4	Diskussion	58
4.1	Genetische Analyse von Spleißformen des EPB41-Gens	58
4.2	Charakterisierung von Klon 9 und Klon 13	58
4.3	Die zelluläre Verteilung der EPB41 - Spleißformen im humanen Hippokampus	60
4.4	Proteinbiochemische Charakterisierung der p4.1R-Proteinisoformen	61
4.5	Funktionelle Regulation von Protein 4.1R-Isoformen	62
4.6	Die Rolle von von Protein 4.1R-Proteinisoformen in verschiedenen Krankheiten	64

Widmung

Für Dorit

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
BCIP	4-bromo-4chloro-3-indolylphosphat
bp	Basenpaare
CA	Cornum ammonis
CASK	Ca ²⁺ -Calmodulin-Kinase II-Dlg/PSD95-Homolog
CD	Kluster-Differenzierungsprotein
cDNA	In DNA umgeschriebene RNA
CTD	C – terminale Domäne
°C	Grad Celsius
d	Tag
dH ₂ O	destilliertes Wasser
Dlg	„disc large protein“
Dm	Drosophila melanogaster
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotid-5´-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
E18	embryonaler Tag 18
E. coli	Escherichia Coli
ECL	Elektrochemilumineszent
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eIF3-p44	Translationsinitiationsfaktor 3-Protein 44
EPB41	Erythrozytäres Protein Bande 4.1
ERM	Ezrin, Radixin, Moesin
FAK	Fokale Adhesionskinasen
FCS	Fötales Kälberserum
FERM Domäne	„four point one“-ERM Domäne, p4.1-ERM Domäne
FITC	Fluoreszein-Isothiocyanat
FKBP	FK506 bindendes Protein
FK506	Immunophilin
g	Gravitation

GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein
GGPP	Geranylgeranylpyrophosphat
GGT-I	Geranylgeranyltransferase-I
GGTI	Geranylgeranyltransferase-I-Inhibitor
HMGCoA	3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl-Coenzym A
hDlg	Humanes Dlg
JAK	Janus Tyrosinkinasen
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
Lova.	Lovastatin
M	Molar
mM	Milimolar
MAGUK	Membran - assoziierte Guanylatkinasen Homolog
MAP	Mikrotubuli - assoziiertes Protein
MBD	Membranbindende Domäne
MeOH	Methanol
Meva.	Mevalonat
min	Minuten
NBT	Nitroblau Tetrazoliumchlorid
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NGS	Normales Ziegenserum
NPC	Niemann Pick Typ C
nt	Nukleotid(e)
NuMa	„nuclear mitotic apparatus protein“
OD _{xy nm}	Optische Dichte bzw. Absorption einer Lösung bei der Wellenlänge xy nm
P1	post nataler Tag 1
p4.1	Protein 4.1
PB	Phosphatpuffer
PBS	„phosphate buffered saline“, Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	„polymerase chain reaction“, Polymerase-Kettenreaktion
PDZ	PSD 95-Dlg-ZO-1 Domäne
PH	Pleckstrin-homologe Domäne

pICln	Regulationsprotein des auswärtsgleichrichtenden Chloridkanals
PIP	Phosphatidylinositol-4-phosphat
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PMD	„Post mortem delay“, Zeitspanne zwischen Tod und Fixation oder Schockfrieren des Gewebes
PSD95	„post synaptic density“ Protein 95
PTP	Proteintyrosinphosphatase
PYK2	Prolinreiche-Tyrosinkinase 2
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	„round per minute“, Umdrehungen pro Minute
RT	Reverse-Transkription
s	Sekunde
SABD	Spektrin-Aktin Bindungsdomäne
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SH2-L	Src-Homologe-2 Domäne
Src	Tyrosin-Kinase des Onkogens src; (Retrovirus: Vogel-Sarkom-Virus)
SSC	Sodiumcitrat-Sodiumchlorid Puffer
TAE	Tris-Acetat-EDTA Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
T _m	Schmelztemperatur
TRITC	Tetramethylrhodaminisocyanat
Triton X-100	t-Oktylphenoxypolyethanol
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tyr-Kin	Tyrosinkinase Domäne
U1-3	Domänen, in der sich die Mitglieder der p4.1 Familie unterscheiden
U2AF35	Hilfsfaktor 35 für den Spleißfaktor U2
V1, 2, 3	Variable Domäne 1, 2, 3
ZO	Zonula Occludens

Vorwort

*Wir werden nicht nachlassen in unserem Forschen
und das Ende unseres Forschens
ist, an den Ausgangspunkt zu kommen
und zum erstenmal den Ort zu erkennen*

T. C. Elliot aus den Metamorphosen

1 Einleitung

1.1 Das Zytoskelett des Neurons

Das Zytoskelett einer Zelle ist ein komplexes Geflecht aus Proteinfilamenten, das sich durch das Zytoplasma erstreckt. Im Neuron sind das Mikrofilament-System, das Mikrotubuli-System und das Neurofilament für die Struktur und Funktion des Zytoskeletts von Bedeutung.

Das Mikrotubuli-System besteht aus polaren Polymeren, die in 13 Protofilamente weiter unterteilt werden können. Die Mikrotubuli werden durch Mikrotubuli-assoziierte Proteine (z.B. MAP-2 und tau-Protein) reguliert und stabilisiert. Neben dem intrazellulären Transport von Membranvesikeln [Vale, 1987; Vale et al. 1985; Vallee et al., 1988] übt das Mikrotubuli-System auch eine strukturierende Funktion auf das endoplasmatische Retikulum und den Golgi-Apparat aus [Allan et al., 1986; Dabora et al. 1988; Lee et al. 1988].

Die Neurofilamentbündel (Neurofibrillen) werden durch Polymerisation von Neurofilament-Protein gebildet. Das Neurofilament hat in der Zelle eine strukturelle und spannungstragende Funktion [Steinert et al., 1988; Traub, 1985].

Das Mikrofilament wird durch Polymerisation von globulären Aktin-Monomeren gebildet und ist Hauptbestandteil von allen Zellen. Der größte Teil des Mikrofilament-Systems ist mit der Plasmamembran über Proteine assoziiert. Das Mikrofilament-System hat große Bedeutung in der Zellwanderung und in der polaren Differenzierung von Zellen.

Für die Ausbildung des neuronalen Netzwerkes müssen Zell-Zell-Kontaktstellen zwischen Neuronen entstehen. 1890 veröffentlichte Ramon y Cajal die Entdeckung des Wachstumskegels als terminale Struktur einer neuronalen Zelle. Die Bewegung des Wachstumskegels ist von dem Mikrotubuli-System und dem Mikrofilament-System abhängig. Das Mikrotubuli-System ist für die Wanderung des Wachstumskegels verantwortlich. Die Richtung des Wachstumskegels wird von dem Mikrofilament-System über die Ausbildung von Lamellipodien und Mikrospikes bestimmt. Hauptvertreter neuronaler Zell-Zell-Kontakte sind axo-dendritische Synapsen.

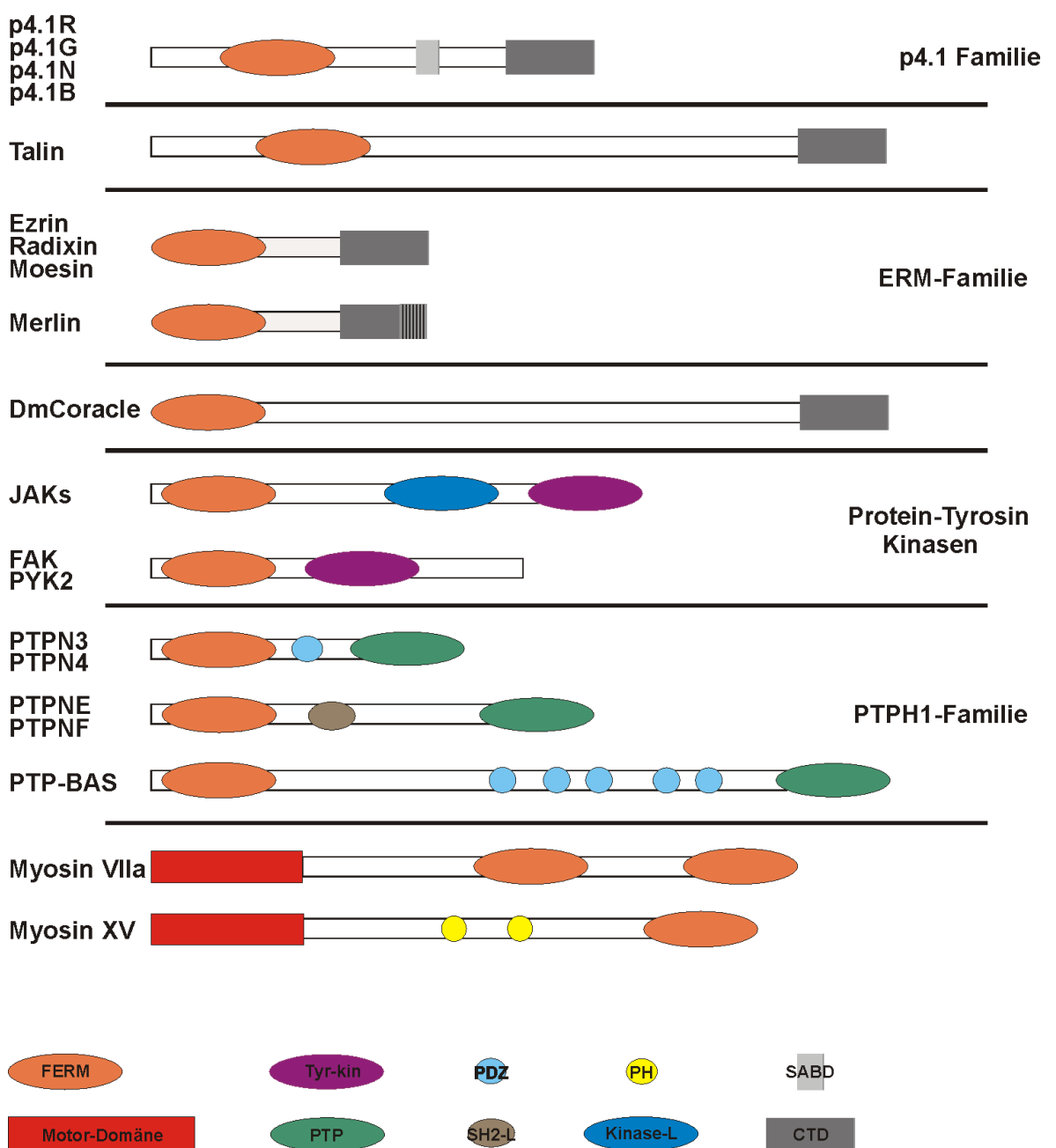
Die polare Differenzierung von Nervenzellen in Dendriten und Axonen ist eine entscheidende Voraussetzung für eine geordnete neuronale Aktivität und damit für die Funktionsfähigkeit des gesamten Nervensystems. Für die Ausbildung und Aufrechterhaltung der Dendriten- und der Axonenstruktur, wie auch für das kompartimentspezifische Sortieren von funktionell wichtigen Membranproteinen, Rezeptoren, Transportern und Ionenkanälen, sind Proteine des Zytoskeletts von großer Bedeutung. Der Protein 4.1-Superfamilie werden regulatorische und strukturierende Funktionen bei der Organisation des Zytoskeletts zugeordnet.

1.2 Die Protein 4.1-Superfamilie

Mitglieder der Protein 4.1-Superfamilie können als periphere Membranproteine bezeichnet werden, die Transmembranproteine - in den meisten Fällen - mit dem Mikrofilament verknüpfen. Der Namensgeber dieser Familie ist das erythrozytäre Protein 4.1 (ehemalige Bezeichnung Bande 4.1, jetzt p4.1R). Gemeinsames Kennzeichen dieser Familie ist die FERM (p4.1, Ezrin, Radixin, Moesin) Domäne, die eine große Homologie zwischen allen Mitgliedern aufweist. Die FERM Domäne ist für die Interaktion mit Transmembranproteinen verantwortlich [Chishti et al., 1998]. Die Mitglieder der Superfamilie sind in Abbildung 1 dargestellt.

Die p4.1-Superfamilie besteht aus der p4.1-Familie, der ERM-Familie [Rouleau et al., 1993; Trofatter et al., 1993], der PTPH1-Familie [Yang et al., 1991] dem Zell-Zell-Kontaktprotein Talin [Rees et al., 1990], dem *Drosophila melanogaster* homologen Protein DmCoracle [Fehon et al., 1994], den Proteintyrosinkinasen Fak ("focal adhesion kinase") und PYK2 ("proline-rich tyrosine kinase 2") [Girault et al., 1999] und den Aktin - bindenden Transportproteinen Myosin VIIa und Myosin XV [Sellers, 1999]. Die Mitglieder der Superfamilie üben in der Zelle unterschiedliche Funktionen aus, so ist eine Beteiligung an Signaltransduktionsvorgängen, Zellzyklus -Kontrolle, Differenzierungs- und Reifungsprozessen sowie an der Gedächtnisbildung nachgewiesen worden [Chishti et al., 1998; Walensky et al., 1998; Yakushijin et al., 1997].

Die Protein 4.1 Superfamilie



1.3 Die Protein 4.1-Familie

Das am längsten bekannte Mitglied der p4.1-Familie ist Protein 4.1R (auch als erythrozytäres Membranprotein Bande 4.1 bezeichnet; p4.1R).

Von dem EPB41-Gen wird durch alternatives Spleißen eine große Anzahl von Isoformen erzeugt, die entwicklungs- und/oder gewebespezifisch exprimiert werden können [Conboy 1993]. Weitere Mitglieder der p4.1-Familie sind die erst im letzten Jahr entdeckten Vertebraten paraloge Gene 4.1N (EPB41L1), 4.1G (EBP41L2) und 4.1B (EBP41L3) [Walensky et al., 1999; Walensky et al., 1998; Kim et al., 1998; Parra et al., 1998; Parra et al., 2000; Peters et al., 1998].

Die p4.1-Familie beinhaltet auch putative p4.1 - Orthologe in *Drosophila melanogaster* [Fehon et al., 1994], *Xenopus laevis* und *Mus musculus*. Die Identität dieser Proteine zu den Vertebraten p4.1R beträgt über die gesamte Sequenz 40% (p4.1N), 43% (p4.1G), 15% (DmCoracle) und 62% (*Xenopus l.* p4.1R). Die Homologie ist signifikant größer in den spezifischen Domänen: FERM Domäne (72-74%), die SABD (50-70%) (nicht in DmCoracle) und die Carboxy-terminale Domäne (CTD) (70-80%).

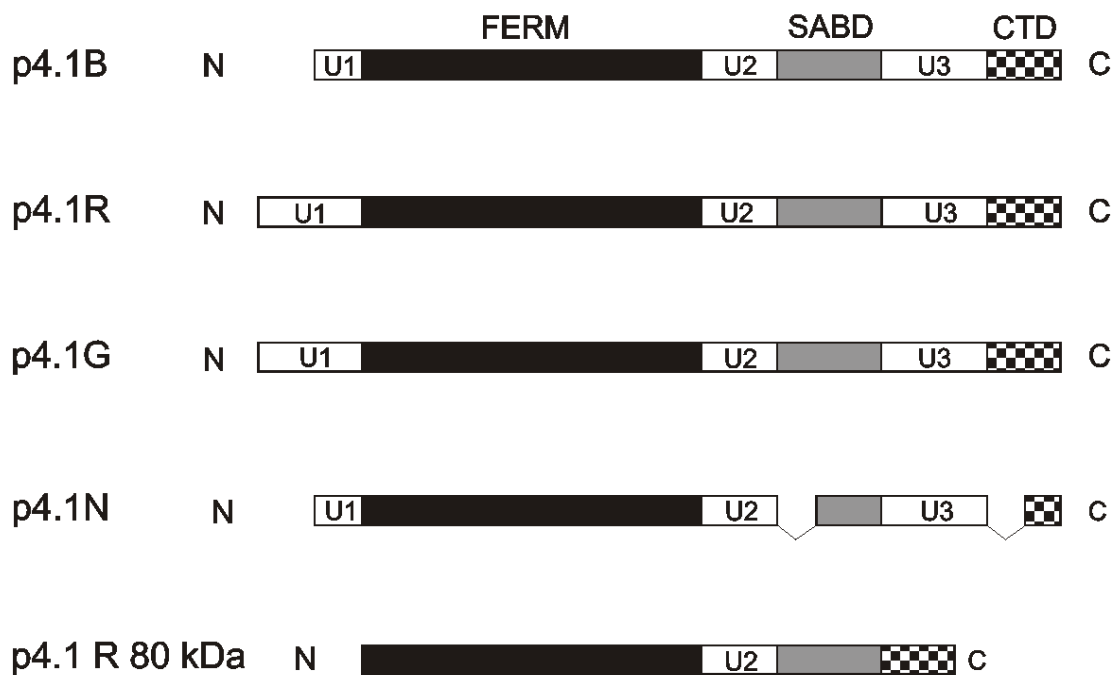
Die Gene, die für die humanen p4.1 Paraloge kodieren, sind auf verschiedenen Chromosomen lokalisiert und zeigen ein unterschiedliches Expressionsmuster in neuronalen Geweben [Kim et al., 1998; Parra et al., 1998; Peters et al., 1998; Fehon et al., 1994].

Tabelle 1: Mitglieder der p4.1-Familie

Familienmitglieder	Lokalisation (Chromosom)	Neuronale- Expression (in Maus und Ratte)
P4.1R	1	Expression in Neuronen des Okzipitalkortex und den Purkinjezellen, sowie in den Körnerzellen des Kleinhirns und der Fascia dentata.
P4.1G	6	Expression in beinahe allen Geweben, im Gehirn Expression in glialen Zellen.
P4.1N	20	Expression in fast allen Neuronen, mit Ausnahme der Purkinjezellen sowie den thalamischen Neuronen.
P4.1B	18	Expression nur in den Purkinjezellen und den thalamischen Neuronen; sowie den Neuronen der CA - Regionen des Hippokampus.
DmCoracle	<i>Drosophila melanogaster</i>	Expression in Geweben ektodermalen Ursprungs.

Protein 4.1-Familie

Sequenzvergleich auf Aminosäurenebene



U1, U2, U3: Domänen in denen sich die einzelnen Mitglieder voneinander unterscheiden

FERM: 72-74% Ähnlichkeit zwischen den Mitgliedern

SABD: 50- 70% Ähnlichkeit zwischen den Mitgliedern

CTD: ca. 70-80% Ähnlichkeit zwischen den Mitgliedern

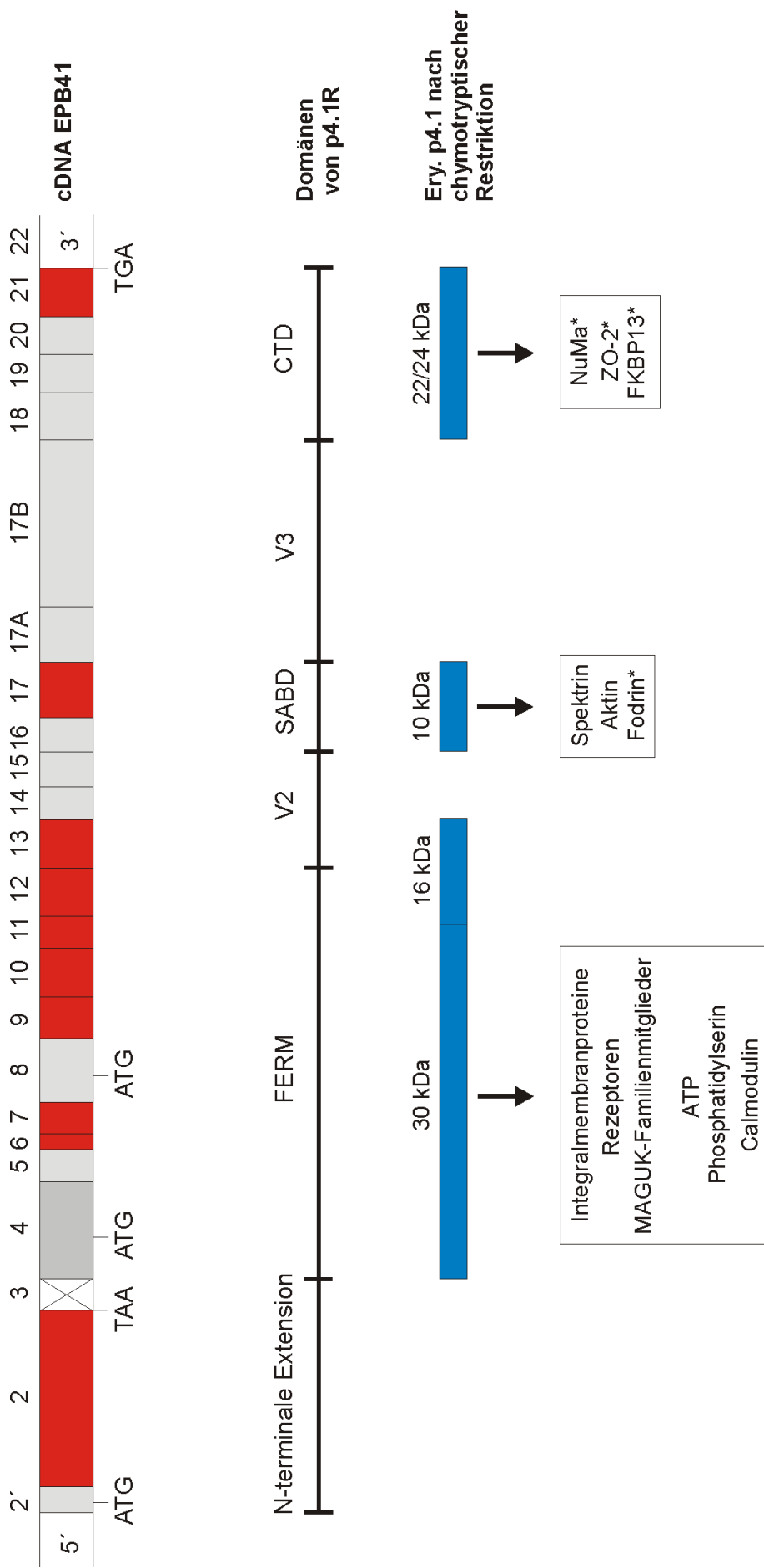
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Domänenorganisation der Proteine der p4.1-Familie. [Parra et al., 2000].

1.4 Alternative Spleißvorgänge des EPB41-Gens

In Maus und Mensch umfaßt das EPB41-Gen (erythrozytäres Protein Bande 4.1) einen Bereich von 200 kb bis 300 kb und beinhaltet 24 identifizierte Exons [Baklouti et al., 1997; Huang et al., 1993], von denen über die Hälfte alternativ sind. Exon 2 und Exon 17 beinhalten noch zusätzlich interne Spleißstellen. Kombinatorische Spleißvorgänge könnten theoretisch eine große Anzahl von p4.1R Spleißformen erzeugen. Bei Untersuchungen von verschiedenen eukaryontischen Geweben konnten nur einige wenige Isoformen detektiert werden [Gascard et al., 1998]. Die exprimierten p4.1R-Isoformen können je nach Zelltypen stark variieren [Conboy et al., 1991a; Schischmanoff et al., 1997; Tang et al., 1990], was auf ein zelltypisches bzw. entwicklungsabhängiges Spleißmuster schließen läßt.

Gewebespezifische Spleißereignisse wurden für die folgenden Exons des EPB41-Gen beschrieben: Exon 17B (exprimiert während der Morphogenese von Säuger-Epithelzellen), Exon 17A (exprimiert in Muskelgewebe) sowie Exon 14 und Exon 15 (exprimiert in neuronalem Gewebe) [Baklouti et al., 1997; Schischmanoff et al., 1997; Chasis et al., 1993; Horne et al., 1993].

Es können aus dem EPB41-Gen Proteine mit unterschiedlichen Molekulargewichten generiert werden. Dies ist davon abhängig, welche der drei Translations-Initiationsstellen benutzt und welche alternativen Exons herausgespleißt wurden. Von der ersten Translations-Initiationstelle (Exon 2') werden Proteine mit einem Molekulargewicht von 110 kDa – 160 kDa, von der zweiten (Exon 4) Proteine von 60 kDa - 80 kDa, und von der dritten (Exon 8) p4.1R-Isoformen mit einem Molekulargewicht von 30 kDa - 60 kDa erhalten.



* Interaktionen mit Proteinen in nicht erythrozytärem Gewebe

- Alternatives Exon
- Konstitutives Exon
- X

 Nicht-kodierendes Exon
- Untranslatierte Region

Abbildung 3 Dargestellt ist die cDNA des EBP41 - Gens mit den alternativen Exons, den konstitutiven Exons und dem nicht - kodierenden Exon. Eingezeichnet sind die jeweiligen Exons des EPB41-Gens, die für die entsprechenden Domänen kodieren. Als Beispiel sind die Peptidfragmente des erythrozytären 80 kDa p4.1R - Proteins und die Bindungspartner gezeigt, die mit den Fragmenten interagieren können.

1.5 Proteindomänen von Protein 4.1R

Die Variable Domäne 1 (V1)

Diese Region wird auch als N-terminale Domäne bezeichnet und ist nur in höher-molekularen p4.1R-Isoformen zu finden, bei denen das bereits erwähnte Exon 2' nicht herausgespleißt wurde. Diese Domäne ist nicht in allen p4.1R-Proteinisofomen von Säugerzellen konserviert und wird von Exon 2 und zum Teil von Exon 4 gebildet (Exon 3 ist ein nicht kodierendes Exon).

Membranbindende Domäne (MBD), FERM Domäne

Die FERM Domäne wird von den Exons 4-12 kodiert. Von diesen Exons sind 4, 5 und 8 alternativ. Die erste Beschreibung der Domäne erfolgte durch eine α -chymotryptische Restriktion von erythrozytärem Protein 4.1. Bei diesem Verdau wurde das Protein in vier Fragmente gespalten:

30 kDa - N-terminales Fragment (MBD),

16 kDa - Fragment (Phosphorylierungsstellen für Proteinkinase A und C),

10 kDa - Fragment (Spektrin / Aktin Bindungsdomäne; SABD),

22/24 kDa - C-terminales Fragment.

Die FERM Domäne beinhaltet das 30 kDa und Teile des 16 kDa - Fragmentes. Über diese Domäne erfolgt z.B. die Bindung von p4.1R an integrale Membranproteine. Eine ausführlichere Beschreibung ist unter Absatz 1.6 nachzulesen. Die FERM Domäne ist die am höchsten konservierte Domäne in der p4.1-Superfamilie, über die die Zuordnung zur p4.1-Superfamilie erfolgt [Chishti et al., 1998].

Variable Domäne 2 (V2)

Diese Domäne wird von dem konservierten Exon 13 (C-terminaler Teil der vorher beschriebenen 16 kDa Domäne) und den zusätzlichen alternativen Exons 14 und 15 kodiert. Exon 14 und 15 wurden bisher nur bei neuronalen Isoformen nachgewiesen. Die Funktion der Domäne ist zur Zeit noch nicht bekannt.

Spektrin - Aktin bindende Domäne (SABD)

Das alternative Exon 16 und das konstitutive Exon 17 kodieren diese Domäne, über die die Bindung an das Mikrofilament-System der Zelle erfolgt. Diese Domäne ist hochkonserviert, nicht nur unter der p4.1-Familie [Parra et al., 1998; Walensky et al., 1998], sondern auch unter den Orthologen p4.1R Proteinen von Amphibien und Vögeln [Winardi et al., 1995; Parra et al., 1998; Yew et al., 1987]. Das alternative Exon 16 deutet daraufhin, daß diese Domäne nicht in allen p4.1R-Isoformen funktionell gebraucht wird.

Variable Domäne 3 (V3)

Die V3 Domäne wird von den alternativen Exons 17A und 17B exprimiert. Diese Domäne ist in den anderen p4.1-Familienmitgliedern zwischen der SABD und der CTD gelegen [Winardi et al., 1995]. Bei Untersuchungen von EPB41 - Spleißvarianten wurde bisher Exon 17B während der Morphogenese von Säuger-Epithelzellen und Exon 17A in Zellen des Muskelgewebes nachgewiesen [Baklouti et al., 1997; Schischmanoff et al., 1997].

Die C-terminale Domäne (CTD)

Auch diese Domäne ist hoch konserviert und in allen p4.1-Familienmitgliedern sowie dem *Drosophila melanogaster* homologen Protein DmCoracle zu finden. In dieser Domäne liegen die Bindungsstellen für das „Nuclear Mitotic Apparatus Protein“ (NuMA) [Mattagajasingh et al., 1996], das Immunophilin - bindende Protein FKBP13 [Walensky et al., 1998], eIF3-p44, einer Untereinheit des Translations-Initiationsfaktors 3 (eIF3) [Hou et al., 2000], und Bindungsstellen zu dem zur MAGUK-Familie (Membran-assoziierte Guanylatkinase Homolog) gehörenden Zonula Occludens Protein (ZO)-2 und ZO-1 [Mattagajasingh et al. 2000]. Die CTD wird von den Exons 18-21 gebildet, von denen Exon 18, 19 und 20 alternativ sind.

1.6 Bindungspartner der Protein 4.1-Familienmitglieder

Untersuchungen von eukaryontischen Zellen zeigten p4.1R-immunreaktive Proteine mit einem Molekulargewicht von 30 kDa - 210 kDa. Diese p4.1R Proteine konnten in den verschiedensten intrazellulären Bereichen, sowie im Zellkern und an den Zentrosomen nachgewiesen werden.

Über die FERM Domäne kann eine Interaktion mit den folgenden Proteinen erfolgen: Bande 3, Glycophorin C, Calmodulin, humanes „disc large“ Protein (hDlg), p55, Regulationsprotein des auswärts gleichrichtenden Chlorid-Kanals (pICln), Ca^{2+} -Calmodulin-Kinase-II-Dlg/PSD-95-Homolog (CASK), Hyaluronat-bindendes Cluster-Differenzierungsprotein 44 (CD44), Neurexin IV, sowie den Phospholipiden Phosphatidylinositol-4-phosphat und Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat. Die Bindung an Spektrin und Aktin wird durch die SABD ermöglicht. Die CTD vermittelt, wie bereits erwähnt, die Bindung an FKBP13, NuMA, eIF3-p44, ZO-1 und ZO-2 [Walensky et al., 1998; Jöns et al., 1992; Ward et al., 1998; Lue et al., 1994; Marfatia et al., 1994; Kelly et al., 1991; Anderson et al., 1985; Tang et al., 1998; Cohen et al., 1998; Nunomura et al., 1997; Correas et al., 1986; Mattagajasingh et al., 1999].

Die Entdeckung von neuen Transmembranproteinen, die mit p4.1-Isoformen interagieren, wie dem Glykoprotein Paranodin, dem Protein Neurexin IV und Syndecan-2, haben zu einer erweiternden p4.1-Funktion mit der Plasmamembran geführt [Ward et al., 1998; Cohen et al., 1998; Menegoz et al., 1997; Baumgartner et al., 1996]. Bei dem gehirnspezifischen Neurexin-Mitglied Paranodin erfolgt die Bindung an p4.1 über die zytoplasmatische Domäne [Menegoz et al., 1997]. Paranodin ist spezifisch in der paranodalen Region zu finden, wo eine Zellverbindung zwischen Neuronen und glialen Zellen, die für die Myelinierung verantwortlich sind, stattfindet. Die Bindung von DmCoracle an Neurexin IV in *Drosophila Melanogaster* ist für die Bildung der Blut-Hirnschranke entscheidend [Lamb et al., 1998; Baumgartner et al. 1996]. Beide Proteine sind an Zell-Zell-Verbindungen lokalisiert worden [Fehon et al., 1994; Ward et al., 1998; Baumgartner et al., 1996].

Auch im Zellkern wurden p4.1-Isoformen nachgewiesen [Lallena et al., 1998; De Carcer et al., 1995; Krauss et al., 1997a; Krauss et al., 1997b]. Eine mögliche Funktion von p4.1-Isoformen im Zellkern ist die Beteiligung an Spleißvorgängen, da eine Interaktion mit

Spleißfaktoren wie z.B. U2 snRNP Auxiliary Factor 35 (U2AF 35) gezeigt wurde [Lue et al., 1994; Marfatia et al., 1995; Hough et al., 1997; Lallena et al., 1998].

Eine andere Funktion von p4.1 liegt in der Beteiligung am Zusammenführen der mitotischen Spindel während der Zellteilung [Mattagajasingh et al., 1999]. Dabei interagieren die Proteine p4.1, NuMA, und Dynein miteinander. Dieser tertiäre Komplex ist notwendig für die Bildung der mitotischen Spindel [Merdes et al., 1996].

Es ist bekannt, daß MAGUK-Proteine Transmembranrezeptoren mit Ionenkanälen verknüpfen [Anderson, 1996]. Da p4.1-Isoformen einige Vertreter der MAGUK-Familie verankern können, ist eine Mitwirkung von p4.1-Isoformen an solchen Proteinkomplexen der Zell-Zell-Kommunikation möglich. Als Beispiel für diese Komplexe dient das Transmembranprotein Syndecan-2, an das p4.1 binden kann. Syndecan-2 interagiert mit der extrazellulären Matrix und dem Zytoskelett [Carey, 1997]. Man vermutet, daß die Bildung eines ternären Komplexes zwischen p4.1, Syndecan-2 und CASK die Funktion erfüllt, die Verbindung zwischen dem Zytoskelett und der extrazellulären Matrix zu stabilisieren [Hoover und Bryant, 2000].

Eine weitere Funktion von p4.1 wird bei dem Auswachsen und der Plastizität von Neuriten vermutet. Über das "GP1-anchored protein" Contactin kann der Neuriten-Auswuchs aktiviert werden. Contactin interagiert mit dem Neurexin IV und kann so das Signal an das Zytoskelett vermitteln. Die direkte Assoziation von Neurexin IV mit p4.1 verstärkt die Verbindung mit dem darunterliegenden Zytoskelett [Peles et al., 1997].

1.7 Funktionen der Protein 4.1-Familie

Die biophysikalischen Eigenschaften der Erythrozytenmembran wie Deformierbarkeit (um Scherkräften zu widerstehen), sind abhängig von der p4.1R - Beteiligung an dem auf Spektrin basierenden zytoskeletalen Netzwerk.

P4.1R hat die Eigenschaft, durch die Interaktion mit den zytoplasmatischen Domänen von integralen Membranproteinen wie z.B. Glycophorin C und Bande 3, einen stereotypischen tertiären Komplex [p4.1R/Transmembranprotein/MAGUK] an der Plasmamembran zu bilden. Am Beispiel der Interaktion von p4.1R mit Glycophorin C und dem MAGUK-Protein p55 im Erythrozyten soll dieser Komplex erläutert werden.

Die FERM Domäne von p4.1R kann an die zytoplasmatische Domäne von Glycophorin C und an die HOOK Domäne (eine konservierte Domäne der MAGUK-Familie) von p55 binden [Marfatia et al., 1997; Hemming et al., 1994; Nunomura et al., 2000]. Die Bindung der FERM Domäne an Glycophorin C und p55 beruht auf der Interaktion von verschiedenen Aminosäure-Motiven. P55 kann auch direkt über seine PDZ Domäne mit dem C-Terminus von Glycophorin C interagieren, was zur Folge hat, daß die Affinität zur Bindung von p4.1R an Glycophorin C erhöht ist [Hemming et al., 1994]. In der Studie von Nunomura et al. (2000) wurde folgende Reihenfolge in der Bildung des tertiären Komplexes gezeigt. Zuerst kommt es zur Bildung des Heterodimers von p55 mit p4.1R, anschließend erfolgt die Bindung dieses Heterodimers an Glycophorin C. In dieser Studie konnte eine mögliche Regulation des Komplexes über die Konzentration an intrazellulären Ca^{2+} -Ionen gezeigt werden. P4.1R-Isoformen haben zwei Calmodulin Bindungsstellen eine Ca^{2+} -abhängige und eine Ca^{2+} -unabhängige. Bei einem Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle kann Calmodulin nicht mehr binden, dies beeinflusst die Struktur der FERM Domäne und somit die Bindungsaffinität der p4.1R-Isoformen in dem jeweiligen Komplex [Nunomura et al., 2000].

Mutationen im EPB41-Gen oder das Nicht-exprimieren von p4.1R-Isoformen im Erythrozyten hat eine instabile Membran zur Folge, die leicht fragmentiert. So hat die

Abwesenheit von p4.1R zur Folge, daß zum einen der ternäre Komplex zwischen Transmembranproteinen und Proteinen der MAGUK-Familie nicht zustande kommt, und zum anderen die Transmembranproteine nicht mit dem Mikrofilament-System verknüpft werden.

Zusammengefaßt kann man sagen, daß p4.1R-Isoformen zwei wichtige Funktionen ausüben. Zum einen eine Ankerfunktion, welche die Verknüpfung von Komplexen zwischen Proteinen der MAGUK-Familie und Transmembranproteinen ermöglicht, und zum anderen das gleichzeitige Binden an das Mikrofilament-System der Zelle.

Als Beispiel für die letztgenannte Funktion ist in der nachfolgenden Abbildung die Interaktion von p4.1R mit Occludin, ZO-1 und ZO-2 dargestellt [Mattagajasingh et al., 2000]. Eine Regulation von p4.1R-Proteinisoformen könnte auch durch Phosphorylierungsvorgänge des Rho-abhängigen Signaltransduktionsweg erfolgen, da diese Regulation bei Proteine der ERM-Familie bekannt ist. Es wird vermutet, daß z.B. ERM-Proteine aufgrund einer intramolekularen Faltung inaktiv in der Zelle vorliegen. Die Phosphorylierung des Proteins bewirkt eine strukturelle Änderung des Moleküls und dadurch die Aktivierung der Bindungszentren [Pearson et al., 2000].

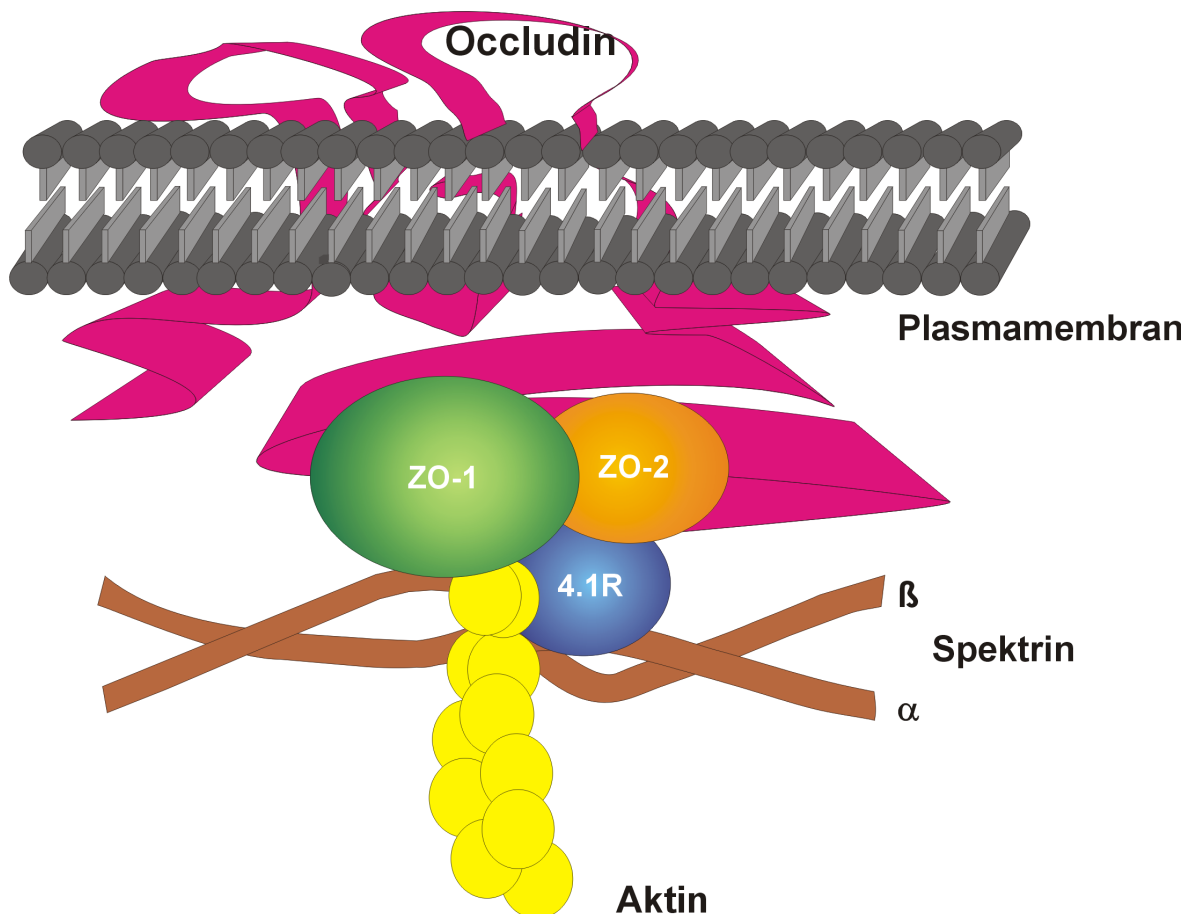


Abbildung 4: Schematische Darstellung der möglichen Rolle von p4.1R in einem tertiären Komplex. Als Beispiel ist die Beteiligung von p4.1R bei der Verknüpfung von „tight junction“ Proteine mit dem Mikrofilament-System der Zelle gewählt [aus Mattagajasingh et al., 2000].

1.8 Neuronale Funktion von p4.1R - Proteinisoformen

P4.1R ist ein wichtiges Element bei der Organisation des Mikrofilament - Systems. Dabei ist die Funktion von p4.1R einerseits die eines „Ankerproteins“ zwischen Transmembranproteinen und Proteinen der MAGUK-Familie, sowie andererseits durch die Verknüpfung dieses Komplexes an das Zytoskelett definiert.

Auf- und Umbau des Zytoskelettes spielen wesentliche Rollen bei neuronaler Plastizität, wie sie bei Prozessen der Entwicklung, dem Lernen und der Gedächtnisbildung, aber auch der De- und Regeneration vorkommen. Mäuse, die gentechnisch so verändert wurden, daß keine p4.1R-Isoformen exprimiert wurden, zeigten neben Veränderungen der Erythrozyten-Morphologie auch Lern- und Verhaltensdefizite [Walensky et al., 1998]. Bei dem Lernprozeß bzw. der Gedächtnisbildung spielt die molekulare Schicht der Fascia dentata eine wichtige Rolle. In diesen Zellen konnten bei Untersuchungen von der p4.1-Familie bisher nur EPB41 - Isoformen detektiert werden [Parra et al., 2000]. Juvenile (Niemann Pick Typ C) und senile Demenzen (Alzheimer) zeigen massive Zytoskelettanomalitäten. In beiden Erkrankungen kommt es zu einer Destabilisierung des Zytoskeletts, wobei sich das die Mikrotubuli - stabilisierende tau - Protein zu unlöslichen Filamenten verbindet. Diese meist paarig helikalen Filamente (PHF) sind lichtmikroskopisch als „tangles“ und „neurophil threads“ in Soma und Dendriten der Neurone zu erkennen. Sihag und Mitarbeiter (1994) konnten zeigen, daß p4.1R-Isoformen ein Bestandteil dieser Tangles sind.

1.9 Ziel der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war herauszufinden, welche höhermolekularen EPB41 - Isoformen im menschlichen Gehirn exprimiert werden. Für diese Untersuchung wurde eine RNA Isolationsmethode für post mortales Gewebe etabliert. Die Gesamt-RNA wurde in cDNA umgeschrieben und mit EPB41 - spezifischen Primern eine PCR durchgeführt. Zwei der klonierten Isoformen (Klon 9 und Klon 13) wurden weiter charakterisiert. Weiterhin wurde eine In-situ-Hybridisierung etabliert und mit EPB41 - spezifischen Sonden das Verteilungsmuster der entsprechenden mRNA in humanem hippocampalen Gewebe untersucht.

Für proteinbiochemische und immunhistochemische Untersuchungen an humanem zerebralen Gewebe wurden gegen erythrozytäres p4.1-Protein, sowie EPB41 - spezifische Peptidantikörper hergestellt.

Weiterhin sollte untersucht werden, ob ein unterschiedliches Verteilungsmuster von EPB41 - Spleißformen zwischen Gesunden und Alzheimer Patienten festzustellen ist.

Experimentell sollte anhand von proteinbiochemischen, immunzytochemischen und molekularbiologischen Untersuchungen festgestellt werden, ob p4.1 - Moleküle in Abhängigkeit des funktionellen Pools von Proteinen der Rho-Familie reguliert werden. Hierzu wurden dissoziierte, neuronale Kulturen des Hippokampus der Ratte als Modellsystem verwendet und p4.1R-Isoformen der Ratte analysiert.

2 Material und Methoden

2.1 Standardprozeduren

Alle Standardmethoden wie Plasmidpräparation, Restriktionsanalyse, gelelektrophoretische Trennung, SDS-PAGE, DNA-Transfektion, RNA-Isolation wurden nach Sambrook et al. (1989) bzw. dem jeweiligen Protokoll des Herstellers durchgeführt. Alle für die Arbeit relevanten, aber modifizierten oder neu entwickelten Methoden werden nachfolgend aufgeführt.

2.2 Gewebespezifikation

Die humanen Gehirne, die in dieser Studie untersucht wurden, stammen aus den neuropathologischen und pathologischen Instituten der Johann Gutenberg Universitätsklinik zu Mainz oder dem Universitätsklinikum Charité Campus Mitte der Humboldt Universität zu Berlin und sind im Rahmen von Routineautopsien entnommen worden (siehe Tabelle 2). In der Arbeit wurden nur humane Gehirne verwendet, die keine signifikanten neuropathologischen Veränderungen - mit Ausnahme der Alzheimer Pathologie - aufwiesen. Hippokampus, Zerebellum, Temporal-, Okzipital- und Frontalkortex wurden herauspräpariert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die verschiedenen Gehirnareale wurden bei -80°C gelagert. Zusätzlich wurden Mikrostanzen von grauer und weißer Substanz aus kortikalen Arealen, sowie Gewebestanzten von Leber, Niere, Herz, Skelettmuskel tiefgefroren.

Tabelle 2: Patientendaten

	Geschlecht	Alter	Autolyse in h	Braak- Stadium	Diagnose
1	m	62	10	0	Peritonitis, Blasencarzinom, Nierenversagen
2	w	74	10	I	akute Myokardinsuffizienz; Pneumonie,
3	m	60	32	I	Herzerkrankung; Niereninsuffizienz
4	w	80	22	I	Schizophrenie
5	w	58	7	I	Herz-Kreislaufversagen; Zervix-Carzinom
6	w	60	32	0	Pneumonie
7	w	48	17	0	Dilatative Cardiomyopathie, Herz-Kreislaufversagen
8	w	72	30	I	Postoperative Wundinfektion, septischer Schock
9	w	58	7	I	Herz-Kreislaufversagen; Zervix-Carzinom
10	w	48	17	0	Kardiomyopathie, Herz-Kreislaufversagen
11	w	60	32	0	Sepsis, Pneumonie
12	m	67	27	0	Magenkarzinom; akutes Herzversagen
13	m	83	8	I	Endocarditis, Herz-Kreislaufversagen
PCR					
14	m	86	14	VI	Bronchopneumonie
15	w	84	4	VI	Lungenembolie, Herzinfarkt
16	w	81	11	VI	Bronchopneumonie
17	w	75	16	VI	SDAT; Cerebralsklerose, Arteriosklerose
18	w	81	15	VI	Herz-Kreislaufversagen
19	m	68	15	I	Schizophrenie,
20	m	64	24	I	Bronchialcarzinom, Hämorrhagischer Schock
21	m	59	21	I	Apoplex; Arteriosklerose; Pneumonie
22	m	87	18	0-I	Dekompensierte Herzinsuffizienz, Pneumonie, Herz-Kreislaufversagen, Cerebralsklerose
23	m	79	17	I-II	Bronchialcarzinom, Blasencarzinom, Herz-Kreislaufversagen
Organe					
24	w	70	20	0	Endogene Psychose
25	m	62	9	0	Sepsis, Aspirationspneumonie
26	w	76	9	0	Meningitis, Herz-Kreislaufversagen

2.3 Isolierung von Gesamt-RNA aus humanem post mortalen Gewebe

Die RNA - Isolation wurde mit peqGold RNAPure™ der Firma Peqlab (Erlangen, FRG), nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Um eine Kontamination der RNA durch Lipide und Proteine gering zu halten, wurde das erste RNA-Pellet in 100 µl dH₂O gelöst, wiederum mit dem RNA-Isolationspuffer peqGold in dem entsprechenden Volumen versetzt und eine erneute Isolation durchgeführt. Die RNA-Pellets wurden in 20 µl dH₂O aufgenommen, mit 1/10 Volumen PCR-Puffer, 5 units DNase I versetzt und für 15 Min bei 37°C inkubiert. Die RNA wurde mit der Ethanol-Methode nach Sambrook et al. (1989) gefällt. Die RNA wurde in einem Volumen von 30 µl gelöst und die Konzentration photometrisch bestimmt.

2.4 Reverse Transkription

Pro RT-Ansatz wurden 1,5 µg Gesamt-RNA mit 10 pmol random-Hexanukleotiden in einem Volumen von 7,5 µl für 10 min bei 70°C inkubiert und anschließend auf Eis gekühlt. 12,5 µl eines Reaktionsmixes, der pro Ansatz 4 µl 5x-Rtase-Puffer, 5 µl 5 mM dNTP's, 5 units RNAsin (Boehringer, Mannheim, FRG) und 2 units Avian Myeloblastosis Virus Reverse-Transkriptase (Promega, Madison, USA) enthielt, wurden hinzugesetzt und die Ansätze für 1 h bei 42°C inkubiert.

2.5 Polymerasen-Ketten-Reaktion

Die als Primer verwendeten Oligonukleotide wurden als Lyophilisat von der TibMolBiol GmbH (Berlin) bezogen und grundsätzlich so gelöst, daß man eine 100 picomolare Lösung erhielt. Für die PCR wurde eine 10 picomolare Lösung verwendet. Ein Standardansatz für die PCR mit einem Endvolumen von 25 µl enthielt: 2 µl des RT-Ansatzes, 15,5 µl dH₂O, 2,5 µl PCR Puffer, je 1 µl Primer, 1,5 µl 25 mM MgCl₂ und 1 µl 2,5 mM dNTP's sowie 1 unit advantage - cDNA - Polymerase (Promega). Soweit als möglich wurden die Reaktionsmixturen aus gemeinsamen Komponenten für die verschiedenen Ansätze hergestellt um das Pipettieren kleiner Volumina zu vermeiden, und möglichst vergleichbare Reaktionsbedingungen zu garantieren. Die PCR-Bedingungen wurden wie folgt programmiert (PCR – Cykler; Tripod, Hybaid; Göttingen, FRG):

Einer anfänglichen Denaturierung bei 95°C für 1 min folgten 10 Zyklen: 45 s Denaturierung bei 95°C, 45 s Annealing (Die Schmelztemperatur (T_m) der eingesetzten Primern -5°C), 1 min 30 s Elongation bei 72°C. Anschließend folgten 25 Zyklen mit 45 s Denaturierung bei 95°C, 1 min 30 s Annealing (T_m der eingesetzten Primern), 2 min 30 s Elongation bei 72°C. Abschließend wurde für weitere 5 min bei 72°C inkubiert, bevor die Ansätze auf Raumtemperatur heruntergekühlt wurden. Die Annealingtemperatur wurde entsprechend der niedrigsten Schmelztemperatur der jeweils verwendeten Primer gewählt, die sich aus der Zusammensetzung ihrer Nukleotide ergab. Die Schmelztemperatur der jeweils verwendeten Primer wurde gemäß der AT-Regel ermittelt (Wallace et al., 1972; Formel gültig für lange Oligonukleotide). Bei den verwendeten Primern wurden in der Regel Annealingtemperaturen zwischen 58°C und 63°C gewählt.

10 µl Aliquots der Ansätze wurden zur Analyse der PCR-Produkte auf 1% TAE-Agarose-Gele aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt.

2.5.1 Primerkombinationen für RT-PCR-Experimente

In der folgenden Tabelle sind die verwendeten Oligonukleotide aufgeführt.

Tabelle 3: Oligonukleotidsequenzen

Bezeichnung	Sequenz (5' -> 3')	Position im Gen (nt)	Orientierung
EPB41 (human)	GCTCTAGAATTCAACATCATGACAACAGAG	40 - 70	sense
	GCTCTAGAATTCGCCGCACCCAGCCCAGAG	85 - 103	sense
	CAAAACAGACCATCTTTGGATCTTCATTC	463 - 492	sense
	GCTGTCGATTCGGCAGACCGAAGTCCTCGGCCC	1583 - 1615	sense
	CTTAACATCAATGGGCAAATCCCCACAGGA	2295 - 2314	sense
	TGTAAAATTCCAAGGGACACCACGAACCTG	761 - 790	antisense
	GAATTGTAGTTACCCGTTTAGGGGTGTCCT	2295 - 2314	antisense
	CCTAAAGTCTCTGTGGCATAA	2208 - 2227	antisense
	TCCTGAGCTCCTCATCAGCAATCTCGG	2546 - 2573	antisense
Aktin (human)	GATATCGCCGCGCTCGTCGTCAC	83 - 103	sense
	AGCCAGGTCCAGACGCAGGATGGC	593 - 616	antisense
Aktin (Ratte)	GTACAACCTCCTTGCAGCTC	261 - 280	sense
	TTGCCGATAGTGATGACCTG	2509 - 2528	antisense
GADPH (Ratte)	AAGATGGTGAAGGTCGGTGTG	20 - 40	sense
	CCTGCTTCACCACCTTCTTGA	770 - 790	antisense
Protein 4.1 (Ratte)	AAGAAGGCTCAGGAGGAGACT	175 - 195	sense
	ACTGTTCTCCATAGTGGTCGAGA	1316 - 1337	antisense

10 µl der PCR-Reaktion wurden auf einem 1,2%igem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, das Gel mit Ethidiumbromid angefärbt und die PCR-Produkte unter UV-Licht sichtbar gemacht. Die Banden wurden mit einem Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten und mit dem DNA-Purification Kit der Firma Biozym (Hessisch Oldendorf, FRG) nach den Angaben des Herstellers eluiert. Zur Mengenabschätzung nach der Elution wurden 1/10 des Volumens auf ein Gel aufgetragen.

Die PCR-Amplifikate wurden in den Vektor pGEMTeasy der Firma Promega nach Angaben des Herstellers ligiert.

Die Transfektion von Plasmiden in *Escherichia coli* DH5α wurde nach der bei Sambrook et al. (1989) beschriebenen CaCl₂- Methode durchgeführt.

2.6 Sequenzierung

Die Sequenzierung der Klone wurde von der Firma Sequlab Laboratories Göttingen (Göttingen, FRG) durchgeführt. Sequenzvergleiche mit Genbanken erfolgten über das Internet-Programm des NCBI-Blast (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/). Zur weiteren Analyse

wurden die Sequenzen mit dem Programm DNASTAR der Firma GATC (Konstanz, FRG) ausgewertet.

2.7 In-situ-Hybridisierung

Humane Gehirngewebe wurde nur verwendet, wenn die Proben einen post mortem delay von bis zu 24 h aufwiesen. Die In-situ-Hybridisierung wurde an hippokampalem Gewebe mit Übergang zum entorhinalen Kortex durchgeführt. Am Kryostaten wurden 10 µm dicke horizontale Schnitte angefertigt, die auf gelatinisierte Objektträger aufgezogen wurden. Die Schnitte wurden bei Raumtemperatur 3 h getrocknet und anschließend in 4% Paraformaldehyd für 5 min fixiert. Die Schnitte wurden 10 min in 0,1 M PBS gewaschen, in aufsteigender Ethanolreihe dehydriert und in 100% Ethanol bei 4°C aufbewahrt. Vor Gebrauch wurden die Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe rehydratisiert, und zweimal in 2 x SSC für 10 Min gespült und anschließend für 30 min in 0,1 M Triethanolamine (pH 8,0) azetyliert.

Nach der Azetylierung wurden die Schnitte zweimal in 2 x SSC gewaschen und mit dem Hybridisierungsmix (25% Formamide; 4 x SSC; 50 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ Puffer, pH 7,0; 1 mM EDTA; Hering Sperma DNA 1 mg/ml; Hefe Gesamt-RNA 1 mg/ml; 5 x Denhardt's Puffer) für 2 h bei Raumtemperatur vorhybridisiert.

Als Sonde wurden Oligonukleotide, die am 5'Ende mit Digoxigenin markiert waren, verwendet. Die Oligonukleotide wurden von der Firma Interaktiva Biotechnologie GmbH (Ulm, FRG) bezogen und lyophilisiert geliefert. Nach Angaben des Herstellers wurde eine Stammkonzentration von 1 µg/µl hergestellt. In dem Hybridisierungsmix (25% Formamide; 4 x SSC; 50 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ Puffer, pH 7,0; 1 mM EDTA; Hering Sperma DNA 1 mg/ml; Hefe Gesamt-RNA 1 mg/ml; 5 x Denhardt's Puffer) wurden die Oligonukleotide in einer Endkonzentration von 10 ng/ml eingesetzt und bei Raumtemperatur für 16 h hybridisiert. Nach der Hybridisierung wurden die Schnitte dreimal in 2 x SSC jeweils 15 min, zweimal in 1x SSC jeweils 20 min und dreimal in 0,25 x SSC jeweils 30 min gewaschen.

2.7.1 Der Digoxigenin-Nachweis:

Die Schnitte wurden für 5 min in DIG-1 Puffer (100 mM Tris-HCl, pH 7,5; 150 mM NaCl) bei Raumtemperatur gewaschen und anschließend in 1% Blocking-Reagenz (Boehringer) in DIG-1 Puffer für 30 min geblockt. Für die Detektion des Digoxigenins wurden die Schnitte in 0,3% Triton X-100/DIG-1 Puffer für 15 min äquilibriert. Anschließend wurde das anti-Digoxigenin-Fab-Fragment (alkalische Phosphatase gekoppelt) (Boehringer) in einer Verdünnung von 1:500 in 0,3% Triton X-100/DIG-1 Puffer, für 60 min bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Schnitte wurden zweimal in DIG-1 Puffer für 5 min bei Raumtemperatur und einmal in DIG-3 Puffer (100 mM Tris-HCl; pH 9,5; 100 mM NaCl; 50 mM MgCl₂) für 5 min bei Raumtemperatur gewaschen. Das Entwicklungsmedium (in 10 ml DIG-3 Puffer werden 45 µl Nitroblue tetrazolium chlorid (NBT)-Lösung (75 mg/ml in 70% Dimethylformamid), 35 µl 4-bromo-4-chloro-3-indolylphosphat (BCIP)-Lösung (50 mg/ml in Dimethylformamid) und 1 mM Levamisol gegeben) wurde auf die Schnitte gegeben und bis zu 48 h bei 4°C im Dunkeln entwickelt.

Die Entwicklung wurde mit Dig-4 Puffer (10 mM Tris-HCl; pH 7,5; 10 mM EDTA) abgestoppt und die Schnitte mit Immunmount (Pittsburgh, USA) eingedeckt.

Als Negativkontrolle wurden verschiedene markierte Sense-Oligonukleotide verwendet.

Tabelle 4: Sequenzen der verwendeten Sonden

Bezeichnung	Orientierung	Sequenz (5' -> 3')
Exon 4	Antisense	TCTCCACAACACATTTCATAAACTGTT
Exon 2	Antisense	CTTCTTTGCCTTCTTCCTCGGA
Spleißstelle Klon 9	Antisense	CAGCCATGTCTGTGTTTCTGCACTG
Exon 4	Sense	TGTGTTGTGGAGAAACATGCTAAGG
Exon 2	Sense	GCAGAAACACAGAAACATGCTAAGG

2.8 Antikörperherstellung

2.8.1 Herstellung von Antikörpern gegen erythrozytäres Protein 4.1

Das Protein 4.1 wurde aus um Spektrin verminderten inside-out-Vesikeln von humanen Erythrozyten isoliert. Das gereinigte p4.1 wurde gegen PBS dialysiert und 250 µg Protein wurden mit Freund'schem Adjuvants emulgiert. Die Proteinemulsion wurde subskapulär in Neuseeland-Kaninchen injiziert. [Drenckhahn et al., 1993]. Innerhalb von 8 Wochen entwickelten die Kaninchen einen hohen Antiserum-Titer, der mittels Protein-Immunoblots kontrolliert wurde. Durch diese Technik wurden zwei unterschiedliche polyklonale p4.1 Antiseren hergestellt, die als H30 und H31 weitergehend bezeichnet werden. Der Antikörper H9-85 ist ebenfalls ein polyklonales p4.1 Antisera gegen erythrozytäres p4.1 und wurde von Dr. T. Jöns mir zur Verfügung gestellt.

2.8.2 Herstellung von Protein 4.1 - Peptidantikörpern

Die Peptide wurden von Eurogentec (Hestel, Belgien) synthetisiert und mittels HPLC aufgereinigt (Reinigungsgrad von 75%) geliefert.

Tabelle 5: Peptide für die Immunisierung

Peptid	Position	Sequenz (NH ₂ -> COOH)	Exon
1	376 - 391	EHHTFFRLTSTDITPK	10, 11
2	512 - 528	KTHIEVTVPTSNGDQTQ	14
3	529 - 542	KLAEKTEDLIRMRC	15
4	544 - 563	KRERLDGENIYIRHSNLMLE	16
5	Klon 9	CAETQTWLD	2, 6

Zu 5 mg Peptid wurde 5 mg Ovalbumin gegeben und in 5 ml PBS unter Rühren auf Eis gelöst. Anschließend wurde 5 ml einer 2,5% Glutaraldehydlösung zugetropft und 1 h bei 4°C unter Rühren inkubiert. Nach Zugabe von 10 mg Natriumborohydrid wurde für 1 h bei 4°C inkubiert und die gekoppelte Peptidlösung über Nacht gegen PBS dialysiert. 0,5 mg des eingesetzten Peptides wurden wie oben beschrieben mit Freund'schem Adjuvants emulgiert und subskapulär in Neuseeland-Kaninchen injiziert.

Sämtliche hergestellten anti-p4.1 Antikörper wurden im Western-Blot anhand von aufgetrennten präparierten inside-out Vesikeln von humanen Erythrozyten, sowie an Temporalkortexgewebe von Ratte und Mensch getestet.

2.9 Herstellung von Proteinhomogenaten aus post mortalem Gewebe für die Immunoblotanalyse

500 mg gefrorenes humanes Gewebe von Hippokampus, Temporalkortex, Zerebellum, Herz, Leber, Niere und Muskel, sowie Kortex der Ratte wurden mechanisch zerkleinert und im 10fachen Volumen des Homogenisierungspuffers (10 mM Tris-base pH 7,4; 1 mM EDTA; 0.1 mM DTT; 1 µM Leupeptin; 0.3 µM Aprotinin und 1 mM PMSF) homogenisiert. Das Homogenat wurde bei 2000 g für 20 min bei 4°C zentrifugiert, der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und bei 20.000 g für 30 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum in ein neues Eppendorfgefäß überführt und bei 100.000 g für 30 Min bei 4°C zentrifugiert. Das 100.000g Pellet und die Überstände wurden in der Immunoblotanalyse eingesetzt.

2.10 Immunoblot und SDS-PAGE

Von Pellet und Überstand wurde eine Proteinbestimmung durchgeführt. Gleiche Mengen an Protein wurden in einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und im Semi-dry-Blot-Verfahren auf eine Polyvinylidene Difluorid Membran (Schleicher und Schüll, Dassel, FRG) transferiert. Die Membran wurde mit 5% Magermilchpulver geblockt und die gebundenen Immunglobuline (anti-Protein 4.1) wurden durch Meerrettich - Peroxidase - gekoppelten anti-Kaninchen IgG aus Ziege (Dakopatts, Hamburg, FRG) und Chemolumineszenz unter Benutzung des ECL - Detektion Reagents (Amersham, Braunschweig, FRG) sichtbar gemacht.

2.11 Präparation von neuronalem Rattengewebe

Zusätzlich zu den Untersuchungen von humanem Gehirngewebe wurden auch Gehirngewebe der adulten Ratten analysiert. Nach Anästhesieren der Tiere mit Äther, wurden die Ratten dekapitiert und das Gehirn aus der Schädelkalotte entnommen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Um die Rolle der Autolyse in den Proteinuntersuchungen zu klären, wurden Rattengehirne entnommen und Proteinhomogenate zu Beginn des Experimentes hergestellt. Für die Zeitpunkte 12, 24 und 48 h wurden die Gehirne in Plastikfolie gewickelt, um sie vor dem Austrocknen zu schützen und im Kühlraum bei 4°C aufbewahrt. Anschließend wurde zu den jeweiligen Zeitpunkten Proteinhomogenate hergestellt.

2.12 Neuronale und gliale Zellkulturen von Ratten

2.12.1 Neuronale Primärkultur

Hippokampale Neurone wurden aus E18 Rattenembryonen (Wistar) isoliert und in Kultur genommen. Die Zellen wurden dabei in 6 Loch-Platten (Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg, FRG), auf beschichteten Poly-D-Lysin Glasplättchen (Durchmesser 25 mm) mit einer Zelldichte von 60.000 Zellen pro Plättchen ausplattiert. Die Neurone wurden in serumfreiem Neurobasalmedium (Life Technologies GmbH; Gibco, Mannheim FRG), das Supplement B-27 (Life Technologies), 50 µg/ml Gentamycin und 2 mM L-Glutamin (Life Technologies) enthielt, bei 37°C in 95% Luftfeuchtigkeit und 10% CO₂ kultiviert. Das Kulturmedium wurde zweimal wöchentlich gewechselt. Für die Experimente wurden 7 Tage alte Kulturen mit einer Zelldichte von 200 Zellen pro mm² benutzt. Unter diesen Bedingungen waren vor allem neuronale Zellen vorhanden. In der Zellkultur konnten mit

spezifischen Markern weniger als 5% Astrozyten (anti-GFAP, Sigma, Hamburg, FRG) und Mikroglia (anti-Lektin B4, Sigma) nachgewiesen werden.

2.12.2 Primäre astrogliale Kulturen

Astroglial angereicherte Kulturen wurden aus Hippokampi von p1 Wistar Ratten, wie bei McCarthy and de Vellis et al. (1980) beschrieben, präpariert. Die Zellen wurden in 6 Loch-Platten (Falcon, Becton Dickinson) auf Poly-D-Lysin beschichteten Glasplättchen (Durchmesser 25 mm) mit einer Dichte von 30.000 Zellen pro Plättchen ausgesät. Die Astrozyten wurden in DMEM Medium (Life Technologies) mit 10% (w/v) FCS, 50 µg/ml Gentamycin und 100 µM L-Glutamin (Life Technologies), bei 37°C in 95% Luftfeuchtigkeit und bei 5% CO₂ kultiviert. Das Kulturmedium wurde zweimal wöchentlich gewechselt. 14 Tage alte Kulturen wurden für die Experimente verwendet. Unter diesen Bedingungen dominierten in der Kultur astrogliale Zellen. Weniger als 10% Neurone (MAP-2, Sigma) und weniger als 20% Mikroglia (anti-Lektin B4, Sigma) konnten mit spezifischen Markern nachgewiesen werden. Die durchschnittliche Zelldichte betrug 150 Zellen pro mm².

2.12.3 Mikroglia Zellkulturen

Zur Gewinnung von Mikroglia Zellkulturen wurden Mischkulturen aus Hippokampi von P1 Wistar Ratten in poly D-Lysin beschichteten Kulturflaschen (25 cm², Nunc; Life Technologies GmbH, Karlsruhe, FRG) angezogen und 14 Tage lang kultiviert. Zur Trennung der Mikroglia von den Astrozyten wurden die Kulturflaschen für 30 min auf einem Schüttler (100 rpm) inkubiert. Die flottierenden Zellen wurden abgezogen, in ein 15 ml Falcon Gefäß überführt und für 10 min bei 500 g ab zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in Kulturmedium (DMEM, 10% FCS) resuspendiert. Ca. 50 Zellen pro mm² wurden auf Poly-D-Lysin beschichteten Plättchen gegeben. Die Kulturen wurden bei 37°C in 95% Luftfeuchtigkeit bei 10% CO₂ kultiviert. Die Kulturen wiesen eine Reinheit von 70% auf (30% waren noch Astroglia).

2.12.4 Behandlung der Neuronenkultur

Die neuronalen Zellkulturen wurden mit den folgenden Substanzen behandelt. Die Substanzen wurden in der folgender Stammkonzentration aufgenommen und im Medium auf die Endkonzentration eingestellt.

Tabelle 6: Konzentration der Substanzen in den Zellkulturexperimenten

Substanz	Stammlösung	Endkonzentration
Lovastatin(Calbiochem, Bad Soden, FRG)	10 mM ⁽¹⁾	10-50 µM
Mevalonat (Sigma)	2 M in PBS	2 mM
Geranylgeranylpyrophosphat (Sigma)	2 mM in 0,1 M NH ₄ Cl ₄ /MEOH	10 µM
Geranylgeranyltransferase Inhibitor(Calbiochem)	1,5 mM in DMSO	10 µM
Cytochalasin D (Sigma)	100 mM in DMSO	10 µM
Colchizin (Sigma)	100 mM in PBS	50 µM

(1) Ansetzen von Lovastatin nach Cutts et al., BBA 1988

2.12.5 Probenaufbereitung der Zellkultur für die Immunoblotanalyse

Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und anschließend wurde siedender 4 x SDS Probenpuffer (30 µl / Loch) zugegeben. Die lysierten Zellen wurden mit einem Zellschaber vom Untergrund gelöst. Das Lysat wurde in Eppendorfgefäße überführt, bei 90°C für 5 min erhitzt, bei 10.000 g für 5 min zentrifugiert und anschließend bei -20°C tiefgefroren.

2.13 Immunhistochemie

2.13.1 Immunhistochemische Analyse von humanem post mortalen Material.

Nach der Autopsie wurde die linke Hemisphäre in 10 mm große Scheiben geschnitten und in 4% Paraformaldehyd, 15% gesättigte Pikrinsäure in 0,1 M Phosphatpuffer (PB, pH 7,4) fixiert. Der Hippokampus wurde herauspräpariert und in einem Saccharosegradienten (15% und 30% Saccharose, 0,05% NaN₃ in 0,1 M PB) kryoprotectiert. Am Kryostaten wurden senkrecht zu der longitudinalen Achse des Hippokampus 80 µm dicke Schnitte angefertigt und fünfmal für 10 min in PB gewaschen. Anschließend wurde für 30 min in 10% normal goat serum (NGS) in PB geblockt. Die Schnitte wurden für 16 h bei 4°C mit den verschiedenen Antiseren in einer Verdünnung von 1:250 (1% NGS, 0,1% Triton X-100 und 0,1% NaN₃ in PB) inkubiert. Die Schnitte wurden viermal in PB gewaschen und mit anti-Kaninchen biotinylierte Sekundärantikörper aus der Ziege in einer Verdünnung von 1:250 (1% NGS, 0,1% Triton X-100 und 0,1% NaN₃ in PB) für 90 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde viermal in PB gewaschen und die ABC-Reaktion mit dem Vectastain Elite Kit (Vector Laboratories, Burlingham, USA) und Diaminobenzidin (1 mg / ml, 0,01% H₂O₂ in PB) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Schnitte wurden abschließend in PB gewaschen, auf gelatinierte Objektträger gezogen, dehydriert und mit Entellan (Merck, Darmstadt) eingedeckt. Als Kontrolle dienten Schnitte, auf die präabsorbierte Primärantikörper (Inkubation des Primärantikörpers 1:250 mit 3 mg/ml des jeweiligen Antigens) und Schnitte ohne Zugabe von Primärantikörper, wobei die Schnitte aber sonst auf gleiche Weise behandelt wurden. Die Auswertung der Schnitte erfolgte an einem Mikroskop (BX 50) mit Fluoreszenz Aufsatz (BC-FLA) der Firma Olympus (Hamburg, FRG)

2.13.2 Immunzytochemie an Neuronenkulturen

Die auf Glasplättchen kultivierten Neurone wurden zweimal mit PB für 5 min gespült und anschließend in 4% Paraformaldehyd für 15 min bei Raumtemperatur fixiert. Danach wurden die Neurone dreimal mit PB für 10 min gewaschen, in PB (1,5% BSA, 0,1% Triton X-100) für 15 min lysiert und in PB (1,5% BSA) für 15 min blockiert. Als Primärantikörper für die Detektion von EPB41 - Isoformen wurde der Peptidantikörper H2B6 (Peptid 1; siehe Tabelle 5) in einer Konzentration von 1:250 in PB (1,5% BSA) und für die Darstellung des Aktin-Mikrofilamentes wurde FITC-markiertes Phalloidin (Molecular Probes, Leiden, NL) in einer Konzentration von 1:300 in PB verwendet. Die Inkubationszeit für den Antikörper H2B6 betrug 1 h bei Raumtemperatur und für das Phalloidin 2 h bei Raumtemperatur im Dunkeln. Für die Detektion des Primärantikörpers H2B6 wurden die Neurone dreimal für 10 min in PB (1,5% BSA) gespült und anschließend mit einem TRITC-markierten anti-Kaninchen Sekundärantikörper (Molecular Probes) in einer Konzentration von 1:200 in PB (1,5% BSA) für 1 h im Dunkeln inkubiert, wiederum dreimal für 5 min mit PB gespült und mit Vectashield Einbettmedium (Vector Laboratories) auf gelatinierten Objektträger eingedeckt. Als Kontrolle wurde den auf Glasplättchen kultivierten Neurone kein Primärantikörper zugesetzt, aber sonst auf gleiche Weise behandelt wurden. Die Auswertung erfolgte an einem Mikroskop (BX 50) mit Fluoreszenz Aufsatz (BC-FLA) der Firma Olympus.

2.14 Konfokale Laserscanning-Mikroskopie

Die Schnitte für die konfokale Laserscanning-Mikroskopie wurden analog der oben beschrieben Immunhistochemie behandelt. Als Sekundärantikörper wurden fluoreszenzmarkierte Antikörper verwendet. Die Messung wurde an einem Leica Mikroskop DMIRBE, das an einem konfokalen Laser-System von Leica (TCS 40) angeschlossen war, durchgeführt. Als Lichtquelle diente ein Argon-Krypton Laser. Die folgenden Filter wurden verwendet: Fluorub Avidin Anregung 488 nm, Detektionsfilter FITC; Texas Red Anregung 568 nm, Detektionsfilter Tetramethylrhodamin-isocyanat (TRITC). Die erhaltenen Bilder wurden als Tiff-Bitmap abgespeichert. Um eine mögliche Kolokalisation zwischen p4.1R-Isoformen und dem Aktin-Mikrofilament festzustellen, wurden mittels der Software Corel Draw-Photopaint Version 9 (Corel Corporation Limited, Halberg, FRG) roter (p4.1R) und grüner (Aktin) Kanal überlagert, die Kolokalisation der beiden Proteine drückt sich in der Farbe gelb aus.

2.15 Semiquantitative RT-PCR

RNA wurde aus jeweils 1×10^5 behandelten und unbehandelten neuronalen Zellen mit dem „Total RNA Purification Kit Micro“ (Eppendorf, Hamburg) nach Angaben des Herstellers isoliert. Eine mögliche Kontamination von genomischer DNA wurde, wie schon beschrieben, durch DNase Restriktion entfernt. Für die reverse Transkription wurden 1,5 µg Gesamt-RNA eingesetzt. Nach der reversen Transkription wurde der Ansatz mit dem gleichen Volumen dH₂O verdünnt. Die PCR wurde in einem Endvolumen von 25 µl durchgeführt (PCR-Cykler, Biometra, Göttingen, FRG). Zwei µl cDNA wurden als Template, 10 µM Primer, 0,2 mM dNTP-Mix, sowie 0,2 units AGS Taq-Polymerase Gold (Hybaid, Heidelberg) in einem Reaktionsansatz verwendet.

Protein 4.1 Programm

„hot start“ 94°C ; 2 min

Denaturierung: 94°C 15 s

Anlagern: 59°C; 15 s

Elongation: 68°C; 1 min → 29 Zyklen

Endelongation 68°C, 5 min

GAPDH PCR Programm

„hot start“ 94°C; 2 min

Denaturierung: 94°C 15 s

Anlagern: 58°C; 15 s

Elongation: 68°C; 1 min → 22 Zyklen

Endelongation 68°C, 5 min

Aktin PCR Programm

„hot start“ 94°C; 2 min

Denaturierung: 94°C 15 s

Anlagern: 58°C; 15 s

Elongation: 68°C; 1 min → 22 Zyklen

Endelongation 68°C, 5 min

Die PCR-Produkte wurden auf einem 1,5%igen mit Ethidiumbromid gefärbten Agarosegel aufgetrennt und unter UV-Licht sichtbar gemacht.

Die PCR-Produkte der Haushaltsgene GAPDH und Aktin wurden als Referenz für die verhältnismäßige Expression von Protein 4.1 benutzt. Die PCR-Protokolle wurden so standardisiert, daß die Verdoppelung des PCR-Amplifikates sich noch in der exponentiellen Phase befand. Zur Quantifizierung der p4.1 Expression wurde die optische Dichte der PCR-Bande bestimmt. Anschließend wurde die optische Dichte der p4.1 Bande durch die optische Dichte der Haushaltsproteine dividiert. Als Ergebnis erhält man das Verhältnis von p4.1 zu dem jeweiligem Haushaltsprotein. Durch diese Normierung kann man nun die einzelnen Werte miteinander vergleichen. Die Rohdaten wurden mittels der Software GraphPad Prism Version 2.01 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA) ausgewertet. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem Student's T-Test.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchung des EPB41 Gens auf Spleißvarianten im menschlichen Gehirn

Nach der Etablierung der RT-PCR wurde das Expressionsmuster des EPB41-Gens im humanen Gehirn untersucht. Hierfür wurden aus den zerebralen Geweben Hippokampus, Frontal-, Okzipital-, Temporalkortex und Zerebellum RNA isoliert, revers transkribiert und mittels der PCR die drei bekannten Spleißregionen des EPB41-Gens untersucht.

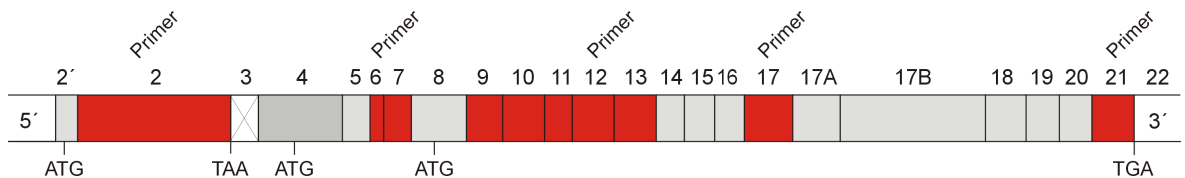


Abbildung 5: Dargestellt ist die cDNA des EPB41-Gens mit der Position der Primer, die für die Generierung von alternativen Spleißformen der Spleißregion 1 (Exon 2-6), Spleißregion 2 (Exon 12-17) und Spleißregion 3 (Exon 17-21) verwendet wurden.

Mit den Primern Exon 2 und Exon 6 wurde die erste Spleißregion, mit den Primern Exon 12 und Exon 17 die mittlere und mit den Primern Exon 17 und Exon 21 die C-terminale Spleißregion untersucht. Mit allen eingesetzten Primern konnte ein reproduzierbares Bandenmuster amplifiziert werden. Mit den Primern für die erste und zweite Spleißregion konnten mehrere Banden amplifiziert werden, im Gegensatz zu der einen Bande der C-terminalen Spleißregion (siehe Abbildung 6). Vergleicht man das generierte Bandenmuster der einzelnen Hirnregionen miteinander, so sind auf die jeweilige Spleißregion bezogen keine wesentlichen Unterschiede im Bandenmuster zu erkennen.

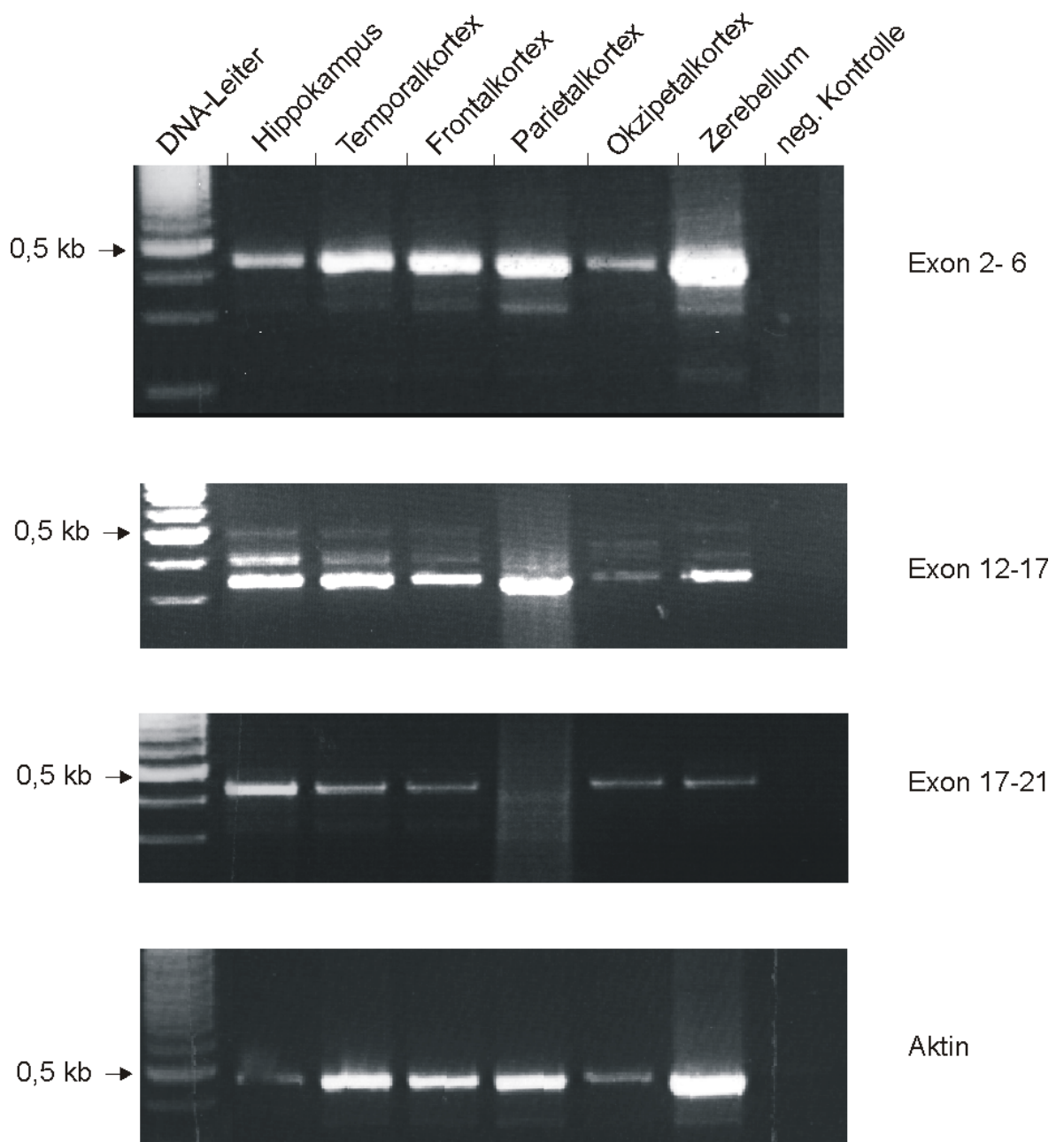


Abbildung 6: Aus den verschiedenen zerebralen Regionen wurde Gesamt-RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Dargestellt sind die generierten Amplifikate über die Spleißregion 1 (Exon 2-6), 2 (Exon 12-17) und 3 (Exon 17-21), sowie das Amplifikat der Aktin-PCR

3.2 Klonierung der Gesamtsequenz

Für die Klonierung der Gesamtsequenz wurden die Primer Exon 2' und Exon 21 verwendet, die die gesamte kodierende Region des EBP41-Gens umspannen. Es wurde in diesem RT-PCR Ansatz cDNA aus verschiedenen kortikalen Geweben verwendet. Für die Amplifikation der Gesamtsequenz der höhermolekularen EPB41 - Isoformen erwies sich die vorher verwendete AGS-Gold-Polymerase als nicht geeignet, da keine bzw. Amplifikate in zu geringer Menge erhalten wurden. Aus diesem Grund wurde diese Polymerase durch die cDNA-Polymerase von Promega ersetzt. Mit dieser Polymerase war es zum einen möglich, Amplifikate in ausreichender Menge für die anschließende Klonierung zu generieren, und zum anderen wurden Amplifikate bis zu einer Länge von

2.5 kb erhalten. Die Amplifikate wurden, wie unter Absatz 2.6 beschrieben, kloniert und sequenziert.

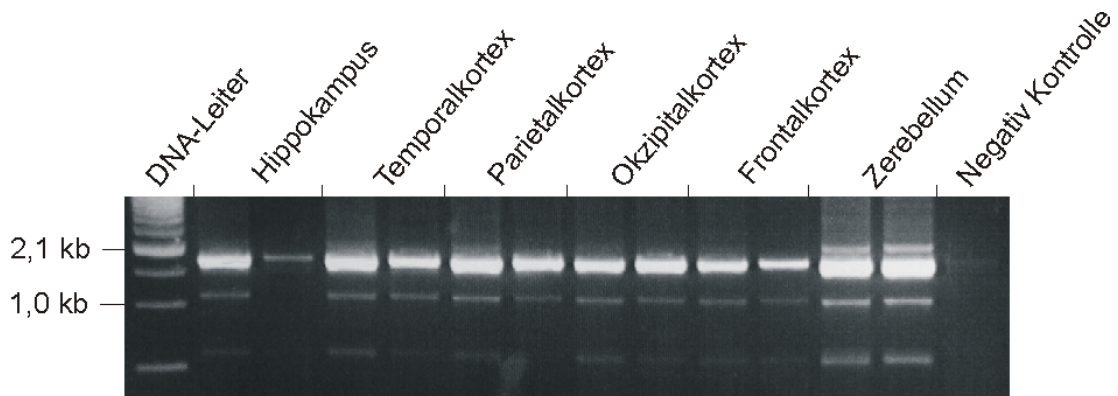


Abbildung 7: Aus den verschiedenen zerebralen Regionen wurde gesamt RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mit Primern die Gesamtlängen von Spleißformen des EPB41-Gens generiert.

Die Sequenzen wurden mit dem Programm „Contig-Express“ aus der Software von DNASTar zusammengesetzt. Von den erhaltenen Klonen wurde Klon 13 und Klon 9 weiter charakterisiert, da es sich bei diesen um höhermolekulare Spleißformen handelte. Die vollständige Sequenz des jeweiligen Klonen wurde mit dem Programm Blast in der NCBI – Gen-Datenbank analysiert. Klon 13 zeigte eine Ähnlichkeit von 97,3% und Klon 9 eine Ähnlichkeit von 98,3% auf Nukleinsäureebene mit HUMEMP41 (die Sequenz des EPB41-Gens cDNA, Genbank accession number M61733). Klon 13 war identisch zu EBP41 (Genbank accession number AF156225). Die Sequenz EPB41 wurde im Juni 1999 von Huang et al. (1999) in der Gendatenbank veröffentlicht, die Arbeitsgruppe isolierte diese Spleißform des EPB41-Gens aus der humanen Neuroblastomzelllinie LAN 5. Ein Sequenzvergleich der beiden Klone mit Vertretern der p4.1-Familie zeigte, daß es sich um Spleißformen des EPB41-Gens handelte. Um festzustellen, aus welchen Exons die Spleißformen gebildet werden, wurde das Alignment-Programm der Software DNASTar verwendet. Die jeweilige DNA-Sequenz eines Exons [nach Baklouti et al., 1997] wurde mit den Sequenzen der Klone verglichen und so überprüft, welche Exons enthalten waren.

Als vereinfachte Übersicht ist in der nachfolgenden Abbildung dargestellt, aus welchen Exons der jeweilige Klon besteht. Im Vergleich ist die Gesamtsequenz des EPB41-Gens aufgetragen.

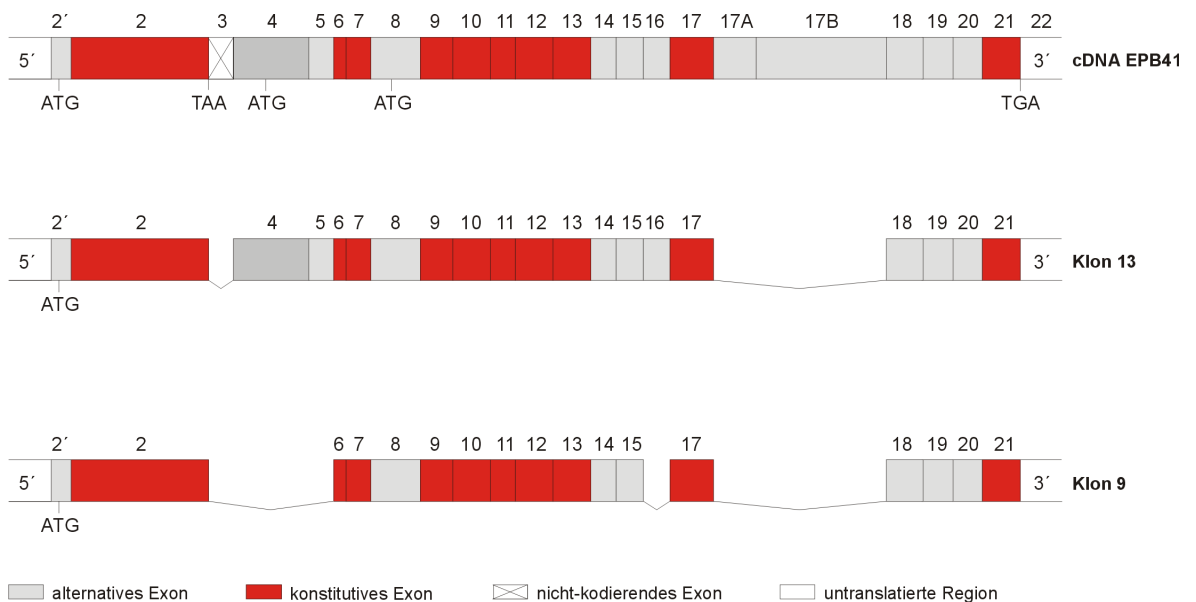


Abbildung 8: Diagramm der generierten EPB41 - Spleißformen. Oben ist die EPB41 cDNA mit den alternativen Exons, den konstitutiven Exons und dem nicht kodierenden Exon dargestellt. Identifizierung der Exons von Klon 9 (EPB41 Δ 3, 4, 5 16, 17a, 17b) und Klon 13 (EPB41 Δ 3, 17a, 17b) im Vergleich zu der cDNA von EPB41

In beiden Klonen ist Exon 2' enthalten. Auf diesem befindet sich die erste Translations-Initiationsstelle, die den Startpunkt für Moleküle mit einem Molekulargewicht von 110 kDa – 160 kDa darstellt. Die FERM Domäne wird durch die Exons 4-12 gebildet. Diese Domäne beinhaltet Motive, die für die Interaktion mit Proteinen wie z.B. Bande 3 (AE1), Glycophorin C, p55 und Calmodulin verantwortlich sind. Bis zum jetzigen Zeitpunkt sind die Bindungsmotive von nur einigen Bindungspartnern, die sich auf der Domäne befinden, identifiziert worden. Auf Exon 5 befindet sich das LEEDY-Motiv über das die Bindung an Glycophorin C und an Bande 3 im Erythrozyten erfolgt. Bei Klon 9 wurde Exon 5 herausgespleißt, woraus resultiert, daß keine Interaktion mit Bindungspartnern über das LEEDY-Motiv erfolgen kann.

In beiden Klonen sind die Bindungsmotive für Calmodulin exprimiert, die Ca^{2+} -abhängige Bindungsstelle auf Exon 9 und die Ca^{2+} -unabhängige Bindungsstelle auf Exon 10. In beiden Klonen sind die Exons 14 und 15 exprimiert. Dies ist einerseits ein Hinweis, daß es sich um neuronale Isoformen des EPB41-Gens handelt, zum anderen ist damit die sogenannte V2 Domäne entstanden, deren Funktion allerdings bisher nicht bekannt ist. Bei Klon 9 wurde Exon 16 herausgespleißt. Exon 16 bildet zusammen mit Exon 17 die Spektrin-Aktin Bindungsdomäne (SABD), über die die Interaktion mit dem Spektrin/Aktin-Filament der Zelle erfolgt. Dies bedeutet, daß Klon 9 so nicht an das Spektrin/Aktin-Filament binden kann. Die C-terminale Domäne (CTD) ist in beiden Klonen vollständig vorhanden

3.3 In-situ-Hybridisierung mit EPB41 - Sonden

Das Expressionsmuster der Spleißformen des EPB41-Gens sowie die Expression von Klon 9 wurden in einer nicht-radioaktiven In-situ-Hybridisierung untersucht. Mit allen verwendeten Antisense-Sonden wurden Neurone detektiert (Abbildung 9). Im temporalen Isokortex war die Markierung in den tieferen Schichten stärker (9 a). Eine Analyse des Hippokampus zeigte ein Hybridisierungssignal in den Neuronen der Fascia dentata, der Cornu ammonis - Regionen (CA) 1-4 und des Subikulums (Abb. 9 b-g). Bei näherer Betrachtung der Körnerzellen erkennt man, daß der Zellkern nicht oder nur schwach

angefärbt wurde (Abb. 9 h). Bei den Pyramidenneuronen des Isokortex oder des Hippokampus war der Zellkern nicht abgrenzbar (Abb. 9 i). Die In-situ-Hybridisierungen mit einer Sense-Sonde zeigten keine Zellfärbung, außer einer unspezifischen Färbung von Lipofuszingranula sowie in einigen Fällen eine Anfärbung von Gefäßen (Abb. 9 j). Die Färbung der Granula waren auch bei der Verwendung von Antisense-Sonden zu erkennen. Dieses unspezifische Signal war deutlich von dem spezifischen Signal der Antisense-Sonde zu unterscheiden, da die Granula z.B. in den apikalen Dendriten des Subikulums von Neuronen lokalisiert sind. Hier wurde kein Hybridisierungsprodukt erwartet und konnte auch keines gefunden werden (Abb. 9 g, siehe Pfeilmarkierung). In keinem der untersuchten Fälle konnte das Hybridisierungssignal in Gliazellen detektiert werden.

Für die Untersuchung der Expression von allen Spleißformen des EPB41-Gens wurden Sonden aus den konservativen Exons 2 und 6 (pan-EPB41 Sonden) gewählt. Mit diesen Sonden zeigten die CA - Regionen des Hippokampus eine leicht unterschiedliche Intensität des neuronalen Signals, das in der Reihenfolge CA1 > CA4 > CA3 > CA2 abnahm. Auch Körnerzellen der Fascia dentata zeigten ein positives Signal, das in der Intensität den Pyramidenneuronen der CA3 Region entsprach. Mit den Antisense-Sonden Exon 2 und Exon 6 wurde die gleiche Färbung erhalten (Abb. 10).

Um die Expression von Klon 9 zu detektieren, wurde eine Sonde über die erste Spleißstelle gelegt (Exons 2-6, siehe Tabelle 4). Im Gegensatz zu den vorher beschriebenen In-situ-Hybridisierungen mit Sonden, die alle EPB41 - Isoformen detektierten, war bei der Verwendung der Klon 9-spezifischen Sonde kein Unterschied in der Signalintensität zwischen den einzelnen CA - Regionen und den Körnerzellen der Fascia dentata zu erkennen. Das erhaltene Signal schien bei gleicher Entwicklungszeit etwa um die Hälfte geringer als bei den verwendeten anderen Sonden, was auf eine niedrigere Expression schließen läßt. (Abb. 10).

Als Kontrolle wurden verschiedene Digoxigenin - markierte Sense-Sonden des EPB41-Gens verwendet und kein Hybridisierungssignal konnte detektiert werden.

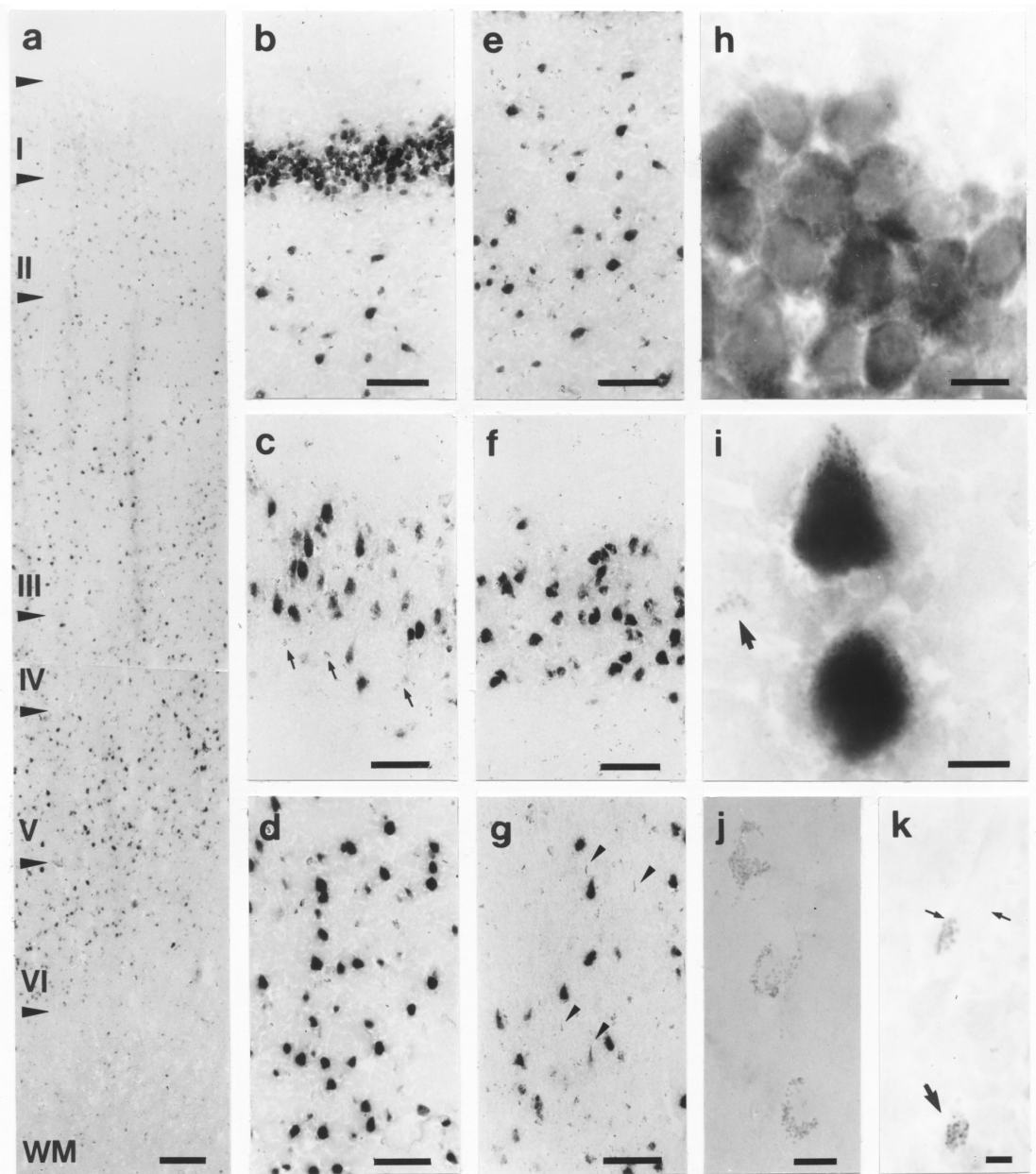
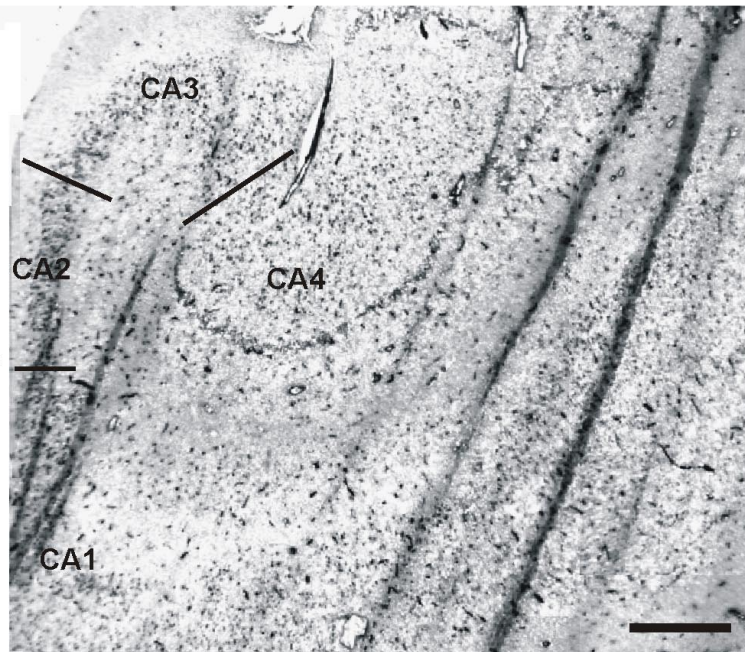


Abbildung 9: In-situ-Hybridisierung mit einer Sonde, die alle Spleißformen des EPB41-Gens detektiert. a) Dargestellt sind die verschiedenen Schichten des Isokortex, in allen Schichten wurden Neurone der grauen Substanz markiert. Die römischen Zahlen kennzeichnen die einzelnen kortikalen Schichten; weiße Substanz (WM). Ein Hybridisierungssignal wurde in der molekularen Schicht, in den Neuronen der Fascia dentata (b), den Cornu ammonis - Regionen CA1 (d), CA2 (f), CA3 (c), CA4 (e) und denen des Subikulums (g) erhalten. Die Pfeilspitzen in (g) deuten auf unspezifisch gefärbte typische Lipofuszingranula in den apikalen Dendriten der Pyramidenneurone des Subikulums. Die Pfeile in (c) und (i) deuten auf Astrozyten, die aufgrund ihrer Lipofuszingranula zu erkennen sind, aber kein Hybridisierungssignal aufweisen. Die Körnerzellen der Fascia dentata (h) zeigen ein im wesentlichen auf das Zytoplasma beschränktes Hybridisierungssignal. Bei der starken Färbung der Pyramidenzellen der CA - Regionen scheint in einigen Fällen eine Markierung des Zellkerns vorzuliegen (i). Eine In-situ-Hybridisierung mit einer Sense-Sonde zeigte keine Zellmarkierung (j, k). Ein Hybridisierungssignal konnte in keinem der untersuchten Fällen (n=4) in Gliazellen nachgewiesen werden. Der Kalibrierungsbalken repräsentiert 200 µm in (a), 100 µm in (b-g), 20 µm in (h-j) und 10 µm in (k).

pan-EPB41-
spezifische Sonde



Klon 9-
spezifische Sonde

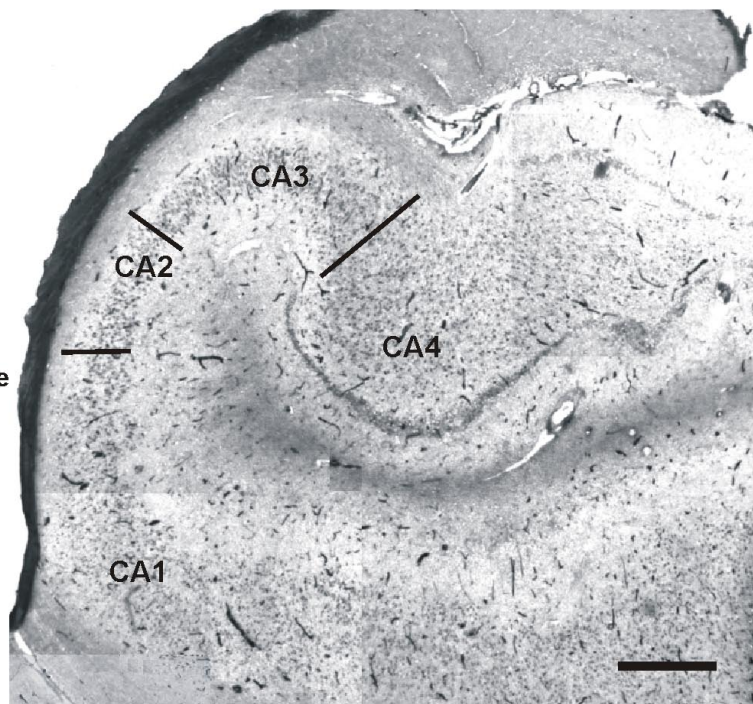


Abbildung 10: Mit den Antisense-Sonden pan-EPB41 (Exon 2) und einer Klon 9 - spezifischen Sonde wurde am humanen Hippokampus eine In-situ-Hybridisierung durchgeführt. Die Entwicklungszeit für beide Sonden war gleich. In der Übersicht ist die leicht unterschiedliche Expression der Antisense-Sonde pan-EPB41 in den Cornu ammonis - Regionen (CA1 > CA4 > CA3 > CA2) zu erkennen. Bei der Klon 9 - spezifischen Sonde sind hingegen keine Expressionsunterschiede zwischen den einzelnen CA-Regionen zu erkennen. Im Vergleich zu der pan-EPB41 - Sonde, die alle EPB41 - Spleißformen detektiert, ist das Signal schwächer. Der Kalibrierungsbalken repräsentiert 500 µm.

3.4 Immunoblotanalyse an humanem Gewebe

Die generierten Antikörper wurden auf ihre Spezifität im Western-Blot an präparierter Erythrozytenmembran, sowie am zerebralen Gewebe von Mensch und Ratte getestet. Jeder der getesteten Antikörper zeigte ein spezifisches Signal, da es durch Präabsorption des Antikörpers mit seinem Antigen ausblieb (Abb. 11).

Für die meisten Immunoblotexperimente wurde das polyklonale Serum H9-85 verwendet. In der Abbildung wurden gleiche Proteinmengen von Hippokampus und Erythrozyten aufgetragen. In der Immunoblotanalyse konnte neben einer 80 kDa auch eine immunreaktive Proteindoppelbande bei 110 kDa und 120 kDa detektiert werden. Diese Banden waren durch Zugabe des Antigens blockierbar (Abb. 11). Auch in anderen Hirnarealen konnten diese Banden nachgewiesen werden (Abb. 12).

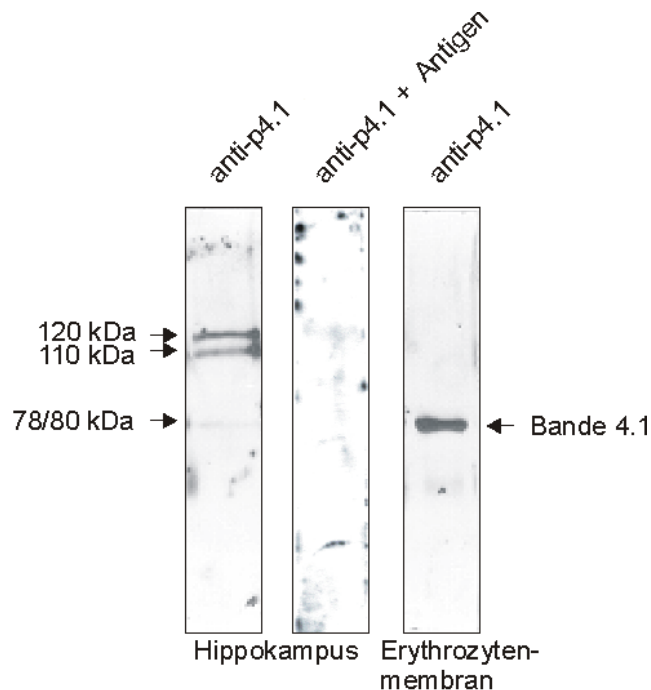


Abbildung 11: Immunoblot einer SDS-PAGE (10%) Trennung von Hippokampus - Proteinextrakten und präparierte Erythrozytenmembranen unter Verwendung des Antikörpers H9-85 (anti - erythrozytäres p4.1). In den zerebralen Gewebe wurden Proteinbanden mit einem Molekulargewicht von 80 kDa, 110 kDa und 120 kDa detektiert, die durch Zugabe des Antigens blockiert werden konnten. Der Antikörper detektierte im aufgetrennten Proteinhomogenat der Erythrozytenmembran nur die 78/ 80 kDa erythrozytäre p4.1 Bande.

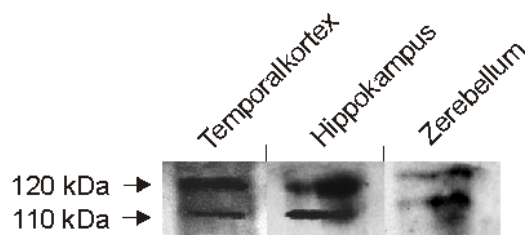


Abbildung 12: Gleiche Mengen an Proteinhomogenat von humanem Temporalkortex, Hippokampus und Zerebellum wurden in einem 10% SDS-PAGE aufgetrennt, geblottet und mit dem Primärantikörper H9-85 inkubiert. In allen untersuchten Hirnregionen konnten die immunreaktiven Proteinbanden von 110 kDa und 120 kDa nachgewiesen werden

Die erythrozytäre p4.1R-Isoform hat ein apparentes Molekulargewicht von 78/80 kDa, wie in der Abbildung 11 zu sehen ist. Die Detektion der 80 kDa Bande in den Hirnhomogenaten könnte entweder auf eine Kontamination durch Erythrozyten in den Hirngeweben oder auf eine neuronale p4.1 Proteinisoform zurückzuführen sein. Mit diesem Experiment konnte keine Aussage über den Ursprung dieser Bande gemacht werden. Hingegen konnte in Proteinextrakten von dissoziierten Neuronen des Hippokampus der Ratte mit den gleichen Antikörper ebenfalls eine 80 kDa Bande nachgewiesen werden (Abb. 20). Die in humanen Hirn detektierte 110 kDa und 120 kDa Proteindoppelbande konnten in Rattenhirnen nicht nachgewiesen werden, statt dessen konnten eine 115 kDa und 130 kDa immunreaktive. Proteindoppelbande detektiert werden.

Die 110 kDa und 120 kDa Proteindoppelbande konnten auch nicht in anderen humanen Geweben detektiert werden, siehe Abbildung 13.

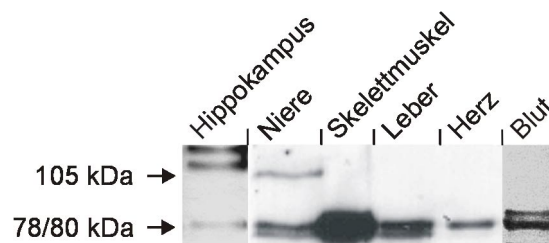


Abbildung 13: Immunoblot einer SDS-PAGE (10%) Trennung, Inkubation mit dem Primärantikörper H9-85. In den nicht - zerebralen Geweben konnten keine höhermolekularen Proteinbanden von 110 kDa und 120 kDa detektiert werden. In Nierengewebe wurde eine höhermolekulare, immunreaktive Proteinbande mit einem Molekulargewicht von 105 kDa detektiert. In allen Geweben wurde die 78 kDa und 80 kDa Bande nachgewiesen

Mittels einer Mikrostanzen wurde jeweils graue und weiße Substanz aus temporalem Hirngewebe entnommen. Die Immunoblotanalyse mit anti - p4.1 - Antiserum konnte nur in der grauen Substanz ein starkes Signal der 110 kDa und 120 kDa Proteinbande detektieren (Abb. 14). Um eine Aussage über die zelluläre Lokalisation der Proteindoppelbande zu treffen, wurde das 100.000 g Pellet und der Überstand (siehe 2.9) elektrophoretisch aufgetrennt und geblottet. Die vorher beschriebenen 110 kDa und 120 kDa immunreaktiven Banden konnten nur im 100.000 g Pellet, nicht jedoch im 100.000 g Überstand detektiert werden.

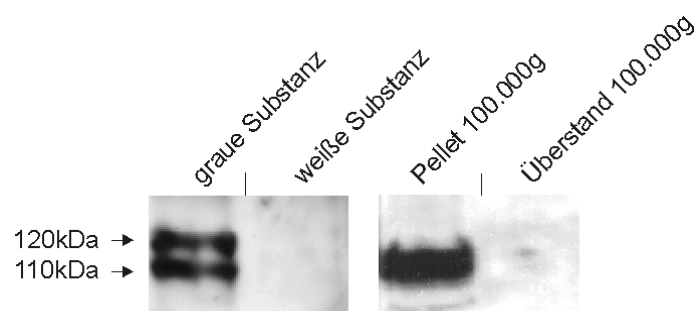


Abbildung 14: Immunoblot einer SDS-PAGE (10%) Trennung, Inkubation mit dem Primärantikörper H9-85. Mittels Mikrostanzen wurde aus Temporalkortex graue und weiße Substanz entnommen. Nur in der grauen Substanz konnten die 110 kDa und 120 kDa Proteinbanden detektiert werden. Der Proteinextrakt wurde in einem weiteren Schritt in ein 100.000 g Pellet „Membranfraktion“ und in den Überstand „Zytosolfraktion“ aufgetrennt. Nur im Pellet (Membranen mit den daran assoziierten Proteinen) konnten die immunreaktiven Proteine nachgewiesen werden.

3.4.1 Immunoblotanalyse mit einem Antikörper gegen die 1. Spleißstelle von Klon 9

Um einen Antikörper zu generieren, der die Klon 9 Spleißform detektiert, wurde ein 8 Aminosäuren langes Peptid verwendet. Die Sequenz wurde aus der Spleißstelle Exon 2,6 (siehe Tabelle 5) abgeleitet. Das Peptid wurde zur Generierung eines polyklonalen Peptidantikörperserums verwendet, das mit H96/4 bezeichnet wurde. Zum Nachweis von Klon 9 wurden gleiche Proteinmengen eines Rattenhirnhomogenats, sowie aus humanem Temporalkortex in einer SDS-PAGE aufgetrennt und geblottet. Mit dem Antikörper H96/4 konnten Proteinbanden mit einem Molekulargewicht von 110 kDa und 120 kDa detektiert werden. Die 120 kDa immunreaktive Proteinbande wies eine deutlich stärkere Färbung auf. Im Gegensatz dazu konnten keine immunreaktiven Proteine im Rattenextraktes detektiert werden, obwohl gleiche Proteinmengen aufgetrennt wurden. Bei einer Präabsorption des Antikörpers H96/4 mit dem Antigen (Peptid) konnten die 110 kDa und 120 kDa Proteinbanden geblockt werden.

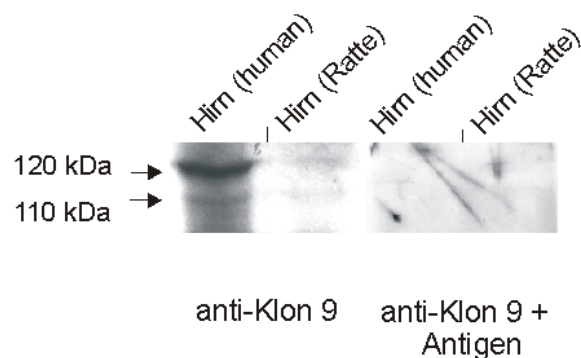


Abbildung 15: Immunoblot einer SDS-PAGE (10%) Trennung unter Verwendung eines Klon 9 - spezifischen Peptidantikörpers. Aufgetrennt wurden gleiche Proteinmengen von humanem Temporalkortex und Gesamthirn der Ratte. Es konnten in humanen Hirn immunreaktive Proteine mit einem Molekulargewicht von 110 kDa und eine 120 kDa Proteinbande nachgewiesen werden, die mit dem Antigen blockierbar waren.

3.5 Immunhistochemische Untersuchung

Die Inkubationen mit dem Antikörper H9-85 (Antigen: erythrozytäres p4.1) und dem Peptidantikörper H2B6 zeigten eine spezifische Färbung neuronaler Somata und Dendriten (Abb. 16 b). Die immunreaktiven Neurone zeigten eine starke punktuierete Färbung von Soma und der Dendriten (Abb. 16 d-g). Auch die feinen Dendriten des Neurons waren angefärbt (Abb. 16 b, g). Mit den verwendeten Antikörpern wurden außer Neuronen keine anderen hirnspezifischen Zellen markiert. In keinem der untersuchten Fälle konnte eine Färbung des Axons, sowie eine spezifische Färbung in der weißen Substanz (Abb. 16 a) nachgewiesen werden. Die Spezifität der Färbung wurde durch Präabsorption des Antikörpers mit dem Antigen überprüft (Abb. 16 c). Die Intensität der Färbung und die Anzahl der angefärbten Neurone variierten. Trotz Präabsorption des Antikörpers mit dem Antigen (Spezifitätskontrolle) blieb die Färbung der Corpora

amylacea, die diffuse Neuropil-Färbung, sowie die Färbung von granulärem Material bestehen (Abb. 16 c). Wurde nur der Sekundärantikörper verwendet, war auch diese Färbung nicht mehr nachzuweisen.

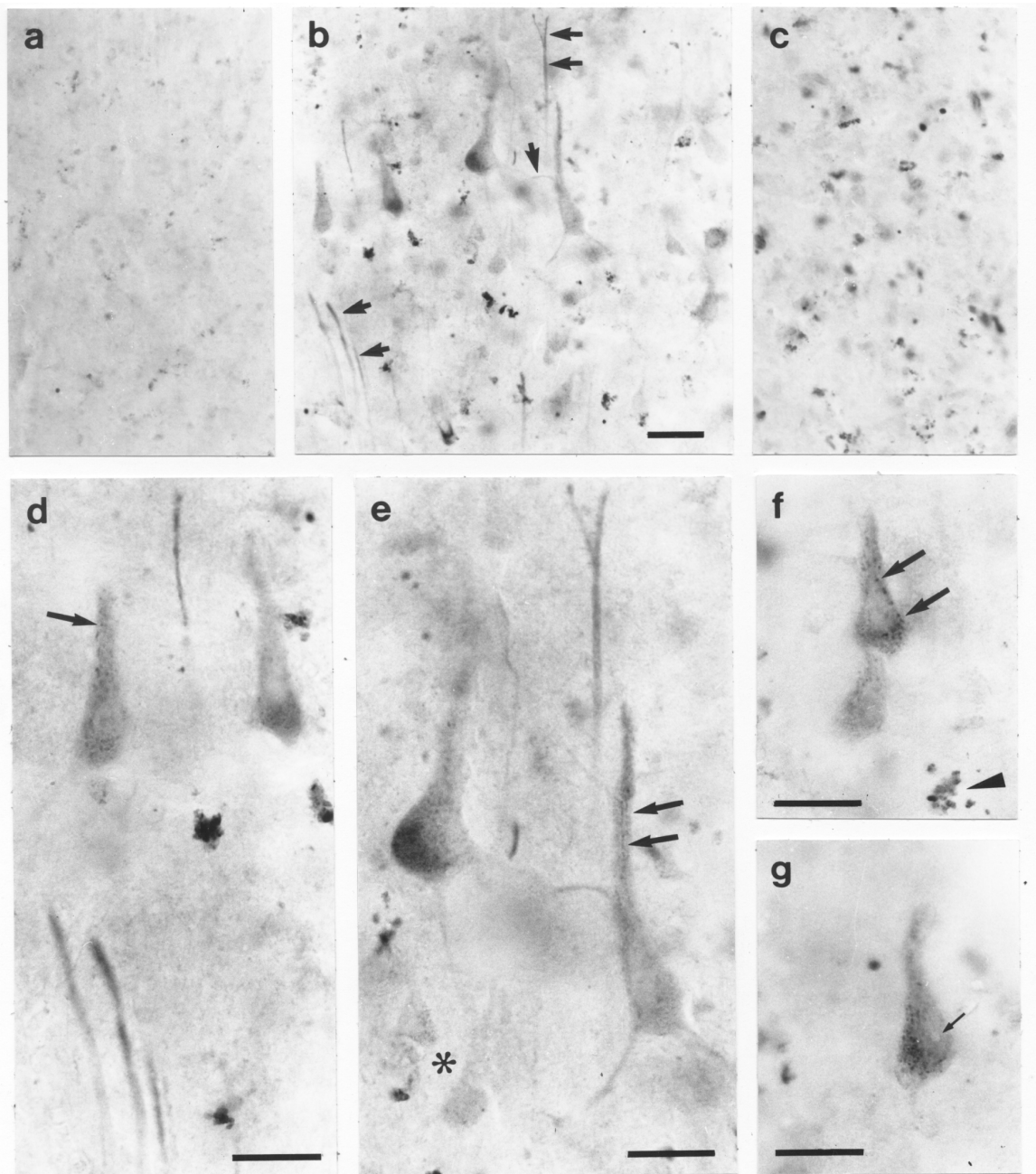


Abbildung 16: Immunhistochemische Färbung von humanem Temporalkortex (80 µm) mit dem Primärantikörper H2B6 [Antigen: Peptid 1] (1:100). In (a) ist die weiße Substanz, die unterhalb des temporalen Isokortex liegt, dargestellt. Es konnten keine gefärbten zellulären Elemente, sondern nur granuläres, im neuropil liegendes immunreaktives Material detektiert werden. Neben der Färbung dieses granulären Materials wurden in der grauen Substanz auch die Perikarya von Neuronen und deren Dendriten (siehe Pfeil) markiert (b). Die neuronale Färbung konnte nach Präabsorption des Antikörpers mit dem Antigen komplett geblockt werden, dies deutet auf eine spezifische Färbung der Neurone hin (c). Neben der zarten und homogenen Markierung der neuronalen Soma und Hauptdendriten wurden auch feinere und kleine Dendriten angefärbt. Bei einer stärkeren Vergrößerung ist eine intensive punktierte Färbung von Soma und Dendriten zu erkennen (d, e), große Pfeile in (d) und (e). Diese punktierte Färbung konnte auch in Regionen nachgewiesen werden, die keine Lipofuszingranula enthielten. Dies läßt darauf schließen, daß die Färbung nicht auf Lipofuszinablagerungen zurückzuführen war (e). Die Immunreaktion variierte beträchtlich, neben einer sehr starken konnte auch eine zarte Färbung von neuronalen Zellen gefunden werden z.B. in (e) die mit einem Stern markierte kleine Gruppe von sehr schwach markierten Neuronen. In (f) sind zwei immunreaktive Neurone dargestellt, die eine typisch intensive, punktierte Färbung des Zytoplasmas (siehe Pfeile) zeigen. Die Pfeilspitze deutet auf eine typische unspezifische Färbung von wahrscheinlich extrazellulärem Material, das auch in (d), (b) und (c) zu sehen ist. Wie in (c) zu erkennen ist, wurde die unspezifische Färbung stärker und zahlreicher, als das spezifische Signal des Antikörpers durch Präabsorption mit dem Antigen blockiert wurde. Der Pfeil in (g) zeigt auf den hellen angefärbten Nukleolus im ebenfalls hellen Kern. Das Zytoplasma ist diffus hell angefärbt, wogegen die feinen intensiv gefärbten Granula hervorstehen. Der Kalibrierungsbalken repräsentiert 50 µm in (a–c) und 25 µm in (d–g).

3.6 Proteinbiochemische Untersuchungen am Rattengewebe

Bei den proteinbiochemischen Untersuchungen an zerebralem Rattengewebe wurde mit den gleichen Antikörpern gearbeitet. Mit den anti p4.1-Antikörpern konnten mehrere immunreaktive Banden im zerebralen Gewebe nachgewiesen werden. Diese hatten ein apparentes Molekulargewicht von 78/80 kDa, 115 kDa und 130 kDa.

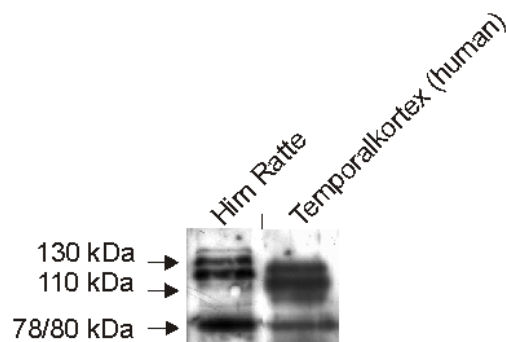


Abbildung 17: Immunoblot einer SDS-PAGE (10%) Trennung, Inkubation mit dem Antikörper H9-85. Im zerebralen Proteinextrakt der Ratte wurden, im Gegensatz zu den p4.1-immunreaktiven Banden von 110 kDa und 120 kDa im humanen zerebralen Proteinhomogenat, Proteinbanden von 115 kDa und 130 kDa detektiert. Gleich waren die Banden bei 78 kDa und 80 kDa.

Wie beim Menschen die 110 kDa und 120 kDa Proteinbanden waren auch bei der Ratte die 115 kDa und 130 kDa Proteinbanden in verschiedenen zerebralen Regionen nachweisbar (Abb. 18 b). Bei der Fraktionsanalyse konnte jedoch sowohl im 100.000 g Pellet als auch im 100.000 g Überstand die p4.1-immunreaktive Doppelbande nachgewiesen werden (Abb. 18 a). Dies läßt darauf schließen, daß die bei der Ratte vorkommenden p4.1-immunreaktiven Proteine nicht nur an Membranen der Zelle lokalisierten, sondern auch im Zytoplasol der Zelle vorkommen.

Die Spezies Mensch und Ratte unterscheiden sich im Bezug auf die p4.1-Isoformen somit in folgenden Punkten:

Die schwereren p4.1-Isoformen unterscheiden sich im Molekulargewicht.

In der Fraktionsanalyse wurden die p4.1-Isoformen bei der Ratte im Membranpellet sowie im Überstand (Zytoplasma der Zelle) detektiert, bei humanem Gewebe hingegen nur im 100.000 g Pellet.

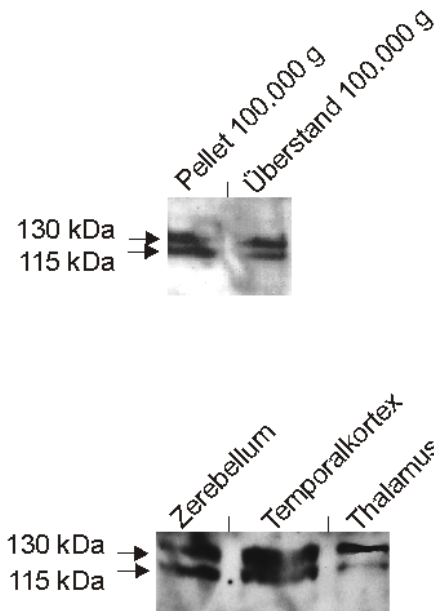


Abbildung 18: Immunoblots einer SDS-PAGE (10%) Trennung, Inkubation mit dem Primärantikörper H9-85. Aus dem Gehirn der Ratte wurde ein Proteinhomogenat hergestellt und dieses in einem weiteren Schritt in eine Membranfraktion (100.000 g Pellet) mit den daran assoziierten Proteinen und eine Zytosolfraktion (100.000 g Überstand) aufgetrennt. Im Gegensatz zum Menschen ist in beiden Fraktionen eine 115 kDa und eine 130 kDa p4.1-immunreaktive Proteinbande nachzuweisen. In dem unten abgebildeten Immunoblot wurden aus dem Rattenhirn Temporalkortex, Thalamus und Zerebellum präpariert und von diesen Proteinhomogenate hergestellt. Die 115 kDa und 130 kDa Banden konnten in Zerebellum, Temporalkortex und Thalamus nachgewiesen werden.

Die Proteinhomogenate aus verschiedenen präparierten Rattenhirnarealen zeigten, daß die p4.1-immunreaktiven Proteine in allen untersuchten Hirnregionen vorkommen, vergleichbar zu den Ergebnissen mit humanem Hirngewebe. Um die Auswirkungen der Autolyse auf die Stabilität von p4.1-immunreaktiven Proteinen zu testen, wurden Rattenhirne entnommen und über unterschiedliche Zeiträume gegen Austrocknung geschützt in einer feuchten Kammer bei 4°C aufbewahrt. Zum Startpunkt des Experimentes (0 h) und nach 12, 24 und 48 h wurden jeweils wie bisher Proteinhomogenate hergestellt und ein Immunoblot mit anti-p4.1 - Antikörpern durchgeführt. Im Zeitraum bis 24 h konnten keine Auswirkungen auf die Menge oder die Stabilität der immunreaktiven Proteine festgestellt werden. Nach 48 h war ein Abbau festzustellen.

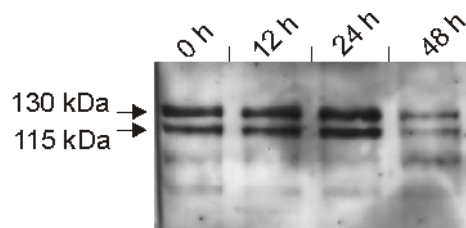


Abbildung 19: Immunoblot einer SDS-PAGE (10%) Trennung, Inkubation mit dem Antikörper H9-85. In diesem Versuchsansatz wurde überprüft, ob post mortale Lagerung (Autolyse) eine Auswirkung auf die Stabilität und die nachweisbare Menge der immunreaktiven Proteine hatte. Dafür wurden Rattengehirne präpariert und diese bei 4°C in einer feuchten Kammer gelagert. Zu Beginn des Versuches (0 h) und nach 12, 24 und 48 h wurden Proteinhomogenate hergestellt.

Um den Zelltyp einzugrenzen, der die 115 kDa und 130 kDa immunreaktiven p4.1 - Proteine bildet, wurden von Wistar - Rattenhirnen Zellkulturen angelegt. Es wurden drei verschiedene Kulturen hergestellt, nahezu reine Neuronen-, Mikroglia- oder Astrogliakulturen. Von allen wurden jeweils Proteinhomogenate hergestellt und ein Western Blot durchgeführt. In den Proteinhomogenaten aus Mikroglia wurden p4.1-immunreaktive Proteinbanden bei 50 kDa und 60 kDa detektiert. Bei Astrozyten konnten p4.1-immunreaktive Proteinbanden bei 80 kDa und 160 kDa und bei Neuronen Proteinbanden bei 50 kDa, 80 kDa, 115 kDa und 130 kDa nachgewiesen werden.

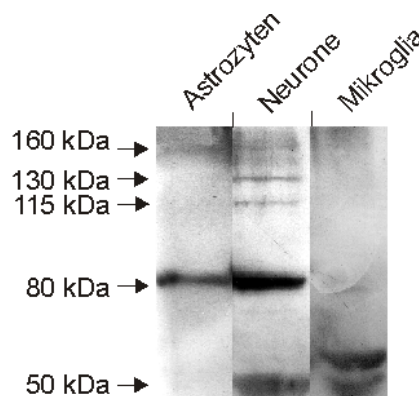


Abbildung 20: Immunoblot einer SDS-PAGE (10%) Trennung, Inkubation mit dem Primärantikörper H9-85. Es wurden die p4.1-immunreaktiven Proteine nachgewiesen. Aufgetrennt wurden die Proteinhomogenate von primären Neuronen-, Astroglia- und Mikroglia-kulturen.

3.6.1 Lokalisation der Protein 4.1-Isoformen im Neuron

Nach den proteinbiochemischen Daten wäre eine zelluläre Färbung des Zytoplasmas, sowie eine Kolokalisation von p4.1 mit dem Aktin-Mikrofilament-System der Zelle zu erwarten. Aus diesem Grund wurden an Neuronenkulturen immunzytochemische Untersuchungen unter Zuhilfenahme der konfokalen Laserscan-Mikroskopie mit anti-p4.1 - Antikörper und FITC-markiertem Phalloidin durchgeführt. In Abbildung 21 sind die p4.1-immunreaktiven Proteine rot und das Mikrofilament-System grün dargestellt. Bei Kolokalisation ergäbe sich somit das Mischbild gelb. Das Perikaryon des Neurons weist ein starkes p4.1 Signal auf. Der Zellkern ist von der Färbung nicht oder nur schwach betroffen.

Die positiv gefärbten Ausläufer der Zelle weisen feine, punktuierete Strukturen auf. In dem Bereich des Hauptdendriten und um den Zellkörper herum ist eine Kolokalisation mit dem Mikrofilament-System anhand der Gelbfärbung zu erkennen.

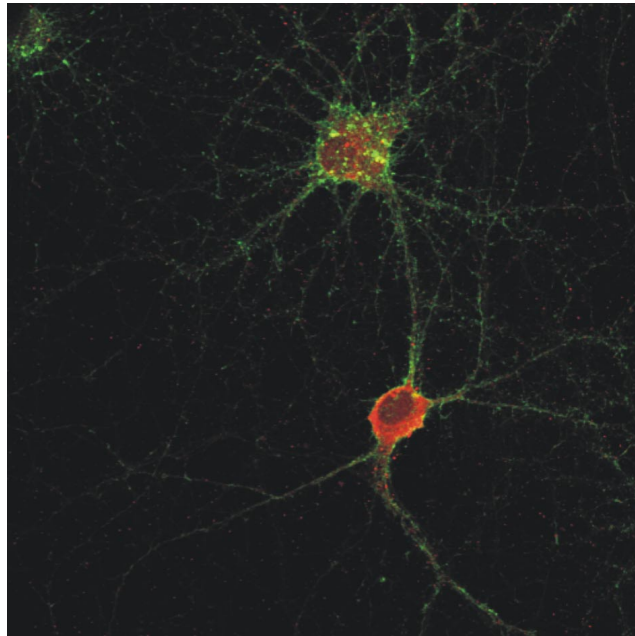


Abbildung 21: Konfokale Laserscan-mikroskopische Darstellung von Neuronen, die mit dem Primärantikörper H2B6 und FITC-markierten Phalloidin gefärbt wurden. In der Abbildung sind die immunreaktiven p4.1 Proteine rot und das Mikrofilament-System der Zelle grün dargestellt. Die Kolokalisation der beiden Proteine stellt sich gelb dar.

3.7 Studien an neuronalen Rattenzellkulturen

3.7.1 Immunoblotanalyse

In der Literatur wurde eine Regulation der ERM-Familie von den Proteinen der Rho-Familie beschrieben. Dabei spielt die Isoprenylierung, das heißt die Übertragung von Geranylgeranylpyrophosphat auf Proteine der Rho-Familie durch die Geranylgeranyltransferase I eine zentrale Rolle. Geranylgeranylpyrophosphat wiederum entsteht über diverse Intermediärprodukte aus Mevalonat. Aus diesem Grund wurde überprüft, ob diese Regulation für die p4.1-immunreaktiven Proteine auch stattfindet.

Hierfür wurden Neurone kultiviert und für mehrere Tage in cholesterinfreiem Medium gehalten. Anschließend wurde die Mevalonatbiosynthese durch Zugabe von Lovastatin gehemmt. Dies hat eine Hemmung der Cholesterinsynthese und auch des Isoprenoidseitenweges der Zelle zur Folge. Um festzustellen, ob bei der Regulation der p4.1-immunreaktiven Proteine die Proteine der Rho-Familie auch tatsächlich eine zentrale Rolle spielen, wurde in einem zweiten Versuchsansatz die Geranylgeranyltransferase-I (GGT-I), die für die Isoprenylierung von Proteinen der Rho-Familie verantwortlich ist, gehemmt. Die Hemmung der GGT-I beeinflusst den endogenen Vorrat der Zelle an funktionellen GTPasen, die für die Signaltransduktionswege (Ras, Rho, Cdc42) notwendig sind.

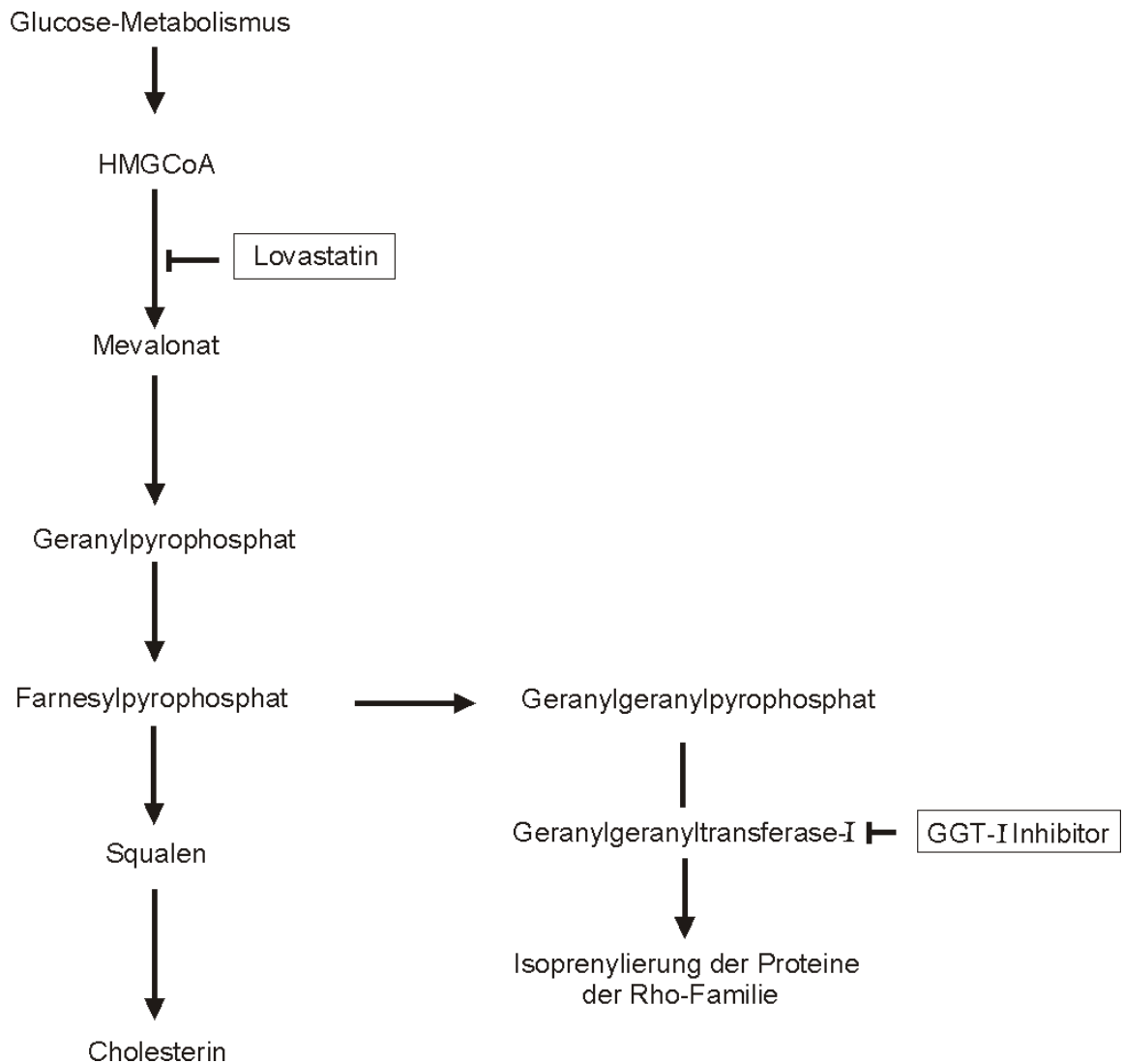


Abbildung 22: Vereinfachte Darstellung der Cholesterinbiosynthese und des Isoprenoidseitenweges

Als Vergleich zu den Zellen, die mit Lovastatin gehemmt wurden, dienten unbehandelte Zellen, Zellen, die mit Lovastatin und Mevalonat, sowie Zellen, die nur mit Mevalonat behandelt wurden. Da eine längere Inkubation mit Lovastatin zur Apoptose (>72 h) führte, wurden die Zellen vor jeder Probenentnahme auf apoptotische Vorgänge hin untersucht. Die Vitalität der Zellen wurde durch Färbung mit Propidiumjodid überprüft und nur vergleichbare vitale Kulturen zu den Immunoblotexperimenten herangezogen. Zu Beginn des Experimentes und nach 1, 2 und 3 Tagen wurden von den jeweiligen Ansätzen Proteinhomogenate hergestellt und im Western Blot mit anti-p4.1 - Antikörpern die Proteinbanden detektiert. Wie in Abbildung 23 dargestellt, ist ab Tag 2 eine Herunterregulation der p4.1-immunreaktiven 115 kDa und 130 kDa Proteinbanden zu erkennen. Ab Tag 3 ist diese Doppelbande verschwunden. Die 80 kDa Proteinbande wurde von dieser Behandlung nicht beeinflusst.

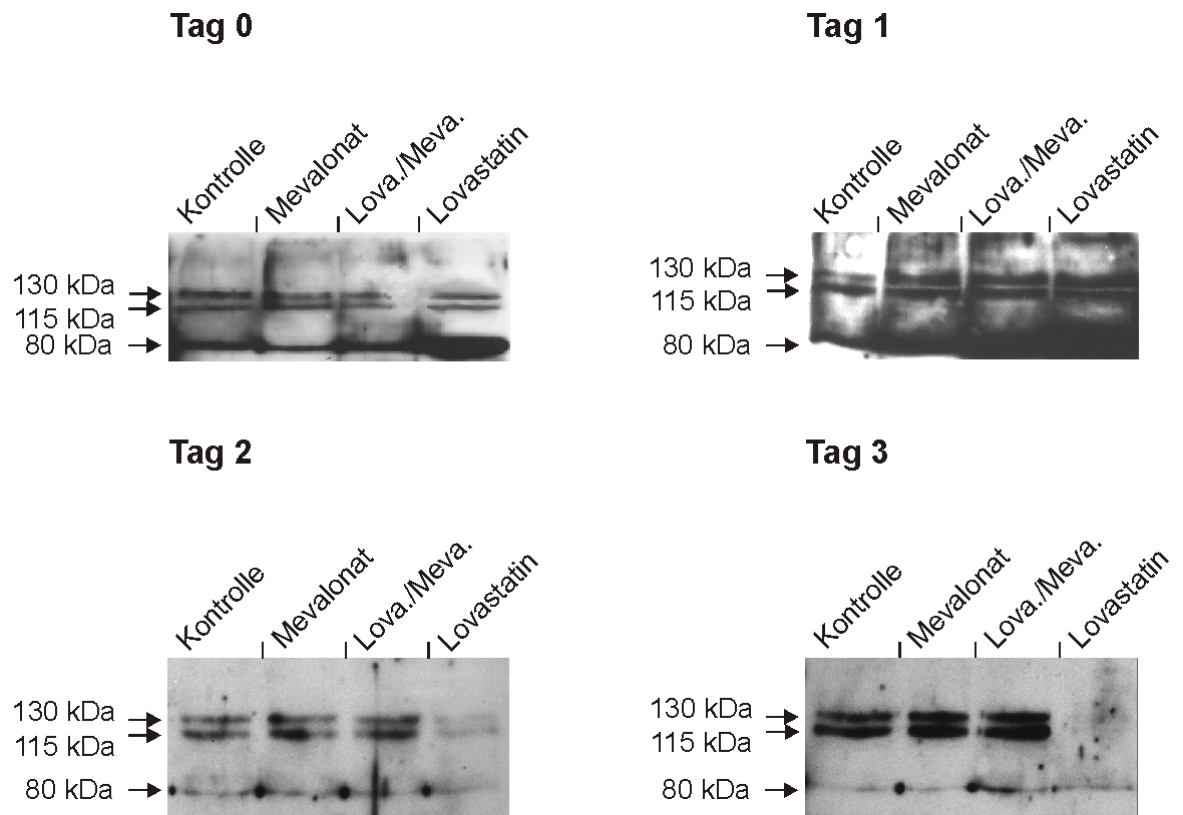


Abbildung 23: Immunoblot einer SDS-PAGE (10%) Trennung, Inkubation mit dem Antikörper H9-85. Eine 7 Tage alte, in cholesterinfreiem Medium gehaltene Neuronenkultur wurde in separaten Versuchsansätzen wie folgt behandelt: Mit Lovastatin; Mevalonat; Lovastatin und Mevalonat. Proteinhomogenate wurden zu Beginn des Experimentes und nach 1, 2 und 3 Tagen hergestellt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Neurone. Zu erkennen ist eine Herunterregulation der 115 kDa und 130 kDa Proteinbande nach 2 Tagen, ab Tag 3 sind diese Banden verschwunden. Die 80 kDa Bande wurde von dieser Behandlung nicht beeinflusst.

3.7.2 Immunzytochemische Analyse

Die Veränderung des Mikrofilamentes des Neurons bei den verschiedenen Behandlungen ist in Abbildung 24 dargestellt.

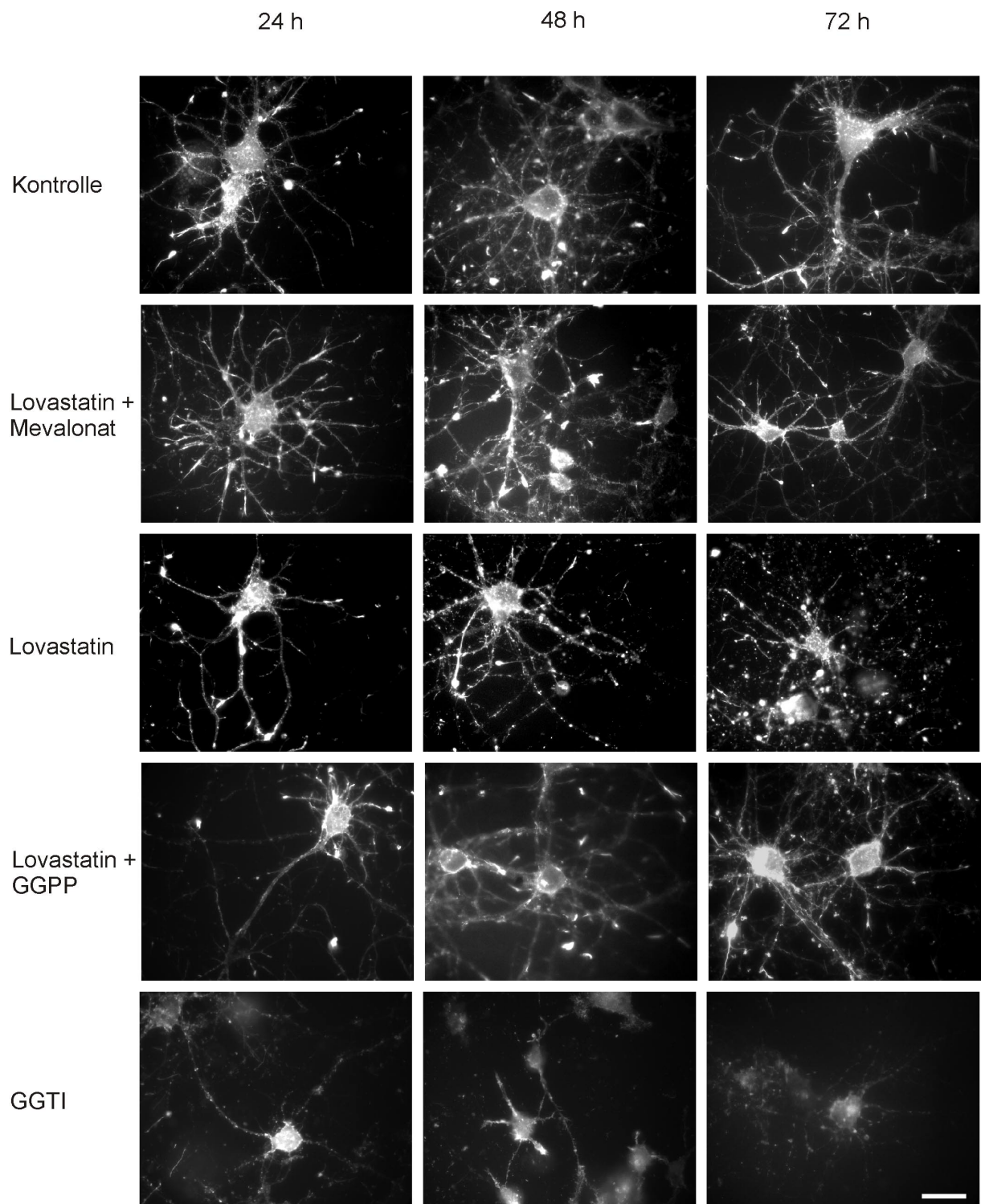


Abbildung 24: Neuronenkulturen, die 7 Tage auf cholesterinfreiem Medium gehalten wurden, wurden in verschiedenen Ansätzen wie folgt behandelt: mit Lovastatin; Lovastatin und Mevalonat; Lovastatin und Geranylgeranylpyrophosphat; GGT-Inhibitor. Nach 24, 48 und 72 h wurden die Zellen mit 4% Paraformaldehyd fixiert und mit FITC-markiertem Phalloidin eine immunfluoreszenz Untersuchung durchgeführt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Neurone. Der Kalibrierungsbalken entspricht 100 µm.

Neurone, die in cholesterinfreiem Medium kultiviert wurden, wurden in verschiedenen Ansätzen mit Lovastatin, Lovastatin und Mevalonat, Lovastatin und GGPP, sowie mit einem Inhibitor der GGT-I behandelt. Nach 24, 48 und 72 h wurden in einem solchen Parallelansatz die unterschiedlich behandelten Neurone mit 4% Paraformaldehyd fixiert. Das Mikrofilament-System der Zelle wurde mit FITC-markiertem Phalloidin sichtbar gemacht. Als Kontrolle dienten unbehandelte Neurone. Im Vergleich zu den Kontrollen waren bei den mit Lovastatin behandelten Neuronen nach 48 h keine Wachstumskegel zu erkennen. Es fanden in den peripheren Bereichen der Neurite Degenerationsvorgänge statt. Das Perikaryon der Neurone war von diesen Vorgängen nicht betroffen. Nach 72 h waren die Zellfortsätze der mit Lovastatin behandelten Neurone im Vergleich zu denen der Kontrollen stark verkürzt und in allen Ausläufern waren Degenerationsvorgänge zu erkennen. In einigen Fällen war auch das Perikaryon von diesen Vorgängen betroffen. Wurde den Lovastatin - behandelten Neurone nach 24 h oder 48 h Mevalonat zugesetzt, so konnten die oben beschriebenen Prozesse aufgehoben werden. Die Neurone bildeten wieder ein neuritisches Netzwerk aus, was dem der unbehandelten Neuronen entsprach. Die Mevalonatzugabe nach 72 h hatte keine Auswirkungen.

Im Vergleich zu den mit Lovastatin - behandelten Zellen fanden bei Neuronen die mit einem Inhibitor der GGT-I (GGTI) behandelt wurden, die Degenerationsvorgänge wesentlich schneller statt. Nach 24 h Inkubation zeigten die Neurone ein sehr gering verzweigtes Netzwerk, und die zellulären Fortsätze waren von diesen Degenerationsvorgängen schon stark betroffen, vergleichbar zu denen nach 48 h Inkubation mit Lovastatin. Das Perikaryon der Zelle zeigte aber noch eine normale Färbung. Nach 48 h waren die Zellfortsätze der Neurone stark verkürzt. An den wenigen kurzen Ausläufern sind jedoch nun mehr kleine Verzweigungen zu erkennen. Die Degenerationsvorgänge waren in den meisten Fällen schon weit fortgeschritten und in einigen Fällen war schon das Perikaryon betroffen. Nach 72 h konnten nur wenige stark geschädigte Zellen detektiert werden. Der größte Teil der Zellen war schon tot.

3.7.3 Semiquantitative RT-PCR

Die Herunterregulation der p4.1-Proteinisoformen könnte noch zusätzlich durch eine verminderte Transkription des Gens oder durch eine Regulation bei der Translation verstärkt werden. Um zu klären, welche der beiden Möglichkeiten stattfindet, wurde eine semiquantitative RT-PCR verwendet. Als Referenzgen wurde die Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH) gewählt. In reproduzierbaren Versuchsansätzen konnte die signifikante Herunterregulation der p4.1 mRNA nachgewiesen werden (Abb. 26a). Ein repräsentatives PCR-Ergebnis ist in der folgenden Abbildung dargestellt.

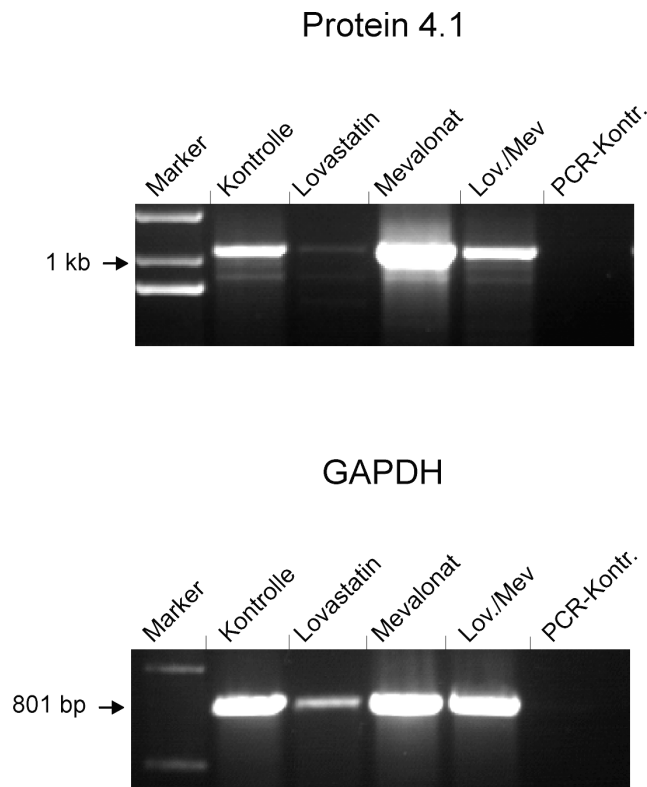


Abbildung 25: Analyse der mRNA von p4.1 und GAPDH in einem semiquantitativen RT-PCR Ansatz. Neuronenkulturen, die 7 Tage auf cholesterinfreiem Medium gehalten wurden, wurden mit Lovastatin, Mevalonat, Lovastatin und Mevalonat behandelt, als Kontrolle dienten unbehandelte Neurone. Nach 2 Tagen wurde aus den Neuronen der verschiedenen Versuchsansätze Gesamt-RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mit spezifischen p4.1- und GAPDH-Primern eine RT-PCR durchgeführt. Zuerst wurden die Zyklenzahl für Protein 4.1 und GAPDH in Konzentrationsreihen so eingestellt, daß die Sättigungsphase noch nicht erreicht wurde. Anschließend wurde eine PCR mit p4.1-Primern und GAPDH-Primern durchgeführt und die Amplifikate in einem 1,5%igen Agarosegel aufgetrennt. Die Gele wurden gefärbt und die optische Dichten der Banden bestimmt. In der Abbildung ist ein typisches Ergebnis der semiquantitativen Untersuchung dargestellt. Eine graphische Darstellung der RT-PCR Ergebnisse ist in Abbildung 26 gezeigt.

Da der Prozeß mit Mevalonat-Zugabe innerhalb von 48 h reversibel war, wurde in einem Versuchsansatz überprüft, ob die Mevalonat-Zugabe eine Auswirkung auf die Transkription des EPB41-Gens hat. In der semiquantitativen Analyse von mit Lovastatin-behandelten Neuronen, die nach 24 h und nach 48 h Mevalonat erhalten hatten, konnte eine signifikante Hochregulation von p4.1 mRNA nachgewiesen werden (Abb. 26 a).

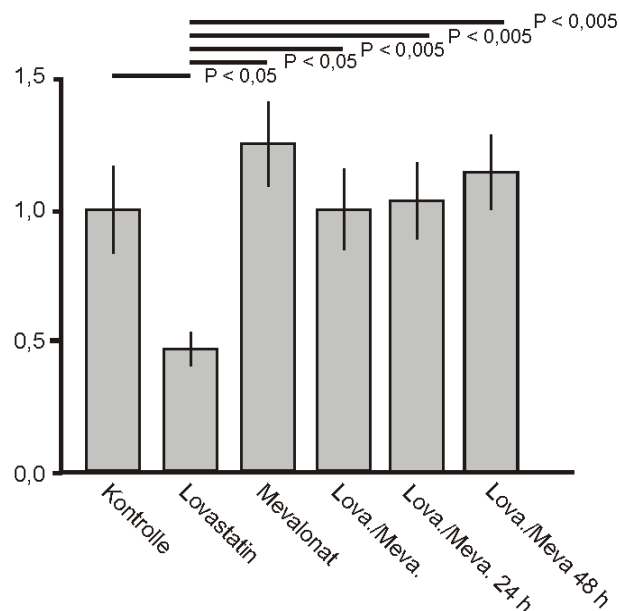
Die Herunterregulation der p4.1 immunreaktiven Protein und der p4.1 mRNA könnten zwei verschiedene Gründe haben. Zum einen im Zuge eines präapoptotischen Vorgangs, zum anderen als Folge des Eingriffs in die Cholesterinbiosynthese. Aus diesem Grund wurde das Mikrofilament-System und das Tubulin-System des Neurons destabilisiert und so eine Apoptose eingeleitet. Das Mikrofilament-System wurde durch Inkubation mit Cytochalasin D in einer Konzentration von 10 und 20 μ M inhibiert und nach 24 h RNA isoliert. Mit diesen Proben wurde eine semiquantitative RT-PCR mit GAPDH- und p4.1-Primern durchgeführt. Es konnte nur ein nicht-signifikantes Schwanken des mRNA-Spiegels von p4.1 festgestellt werden (Abb. 26 b).

Durch Zugabe von Colchicin wurde die Synthese der Mikrotubuli, sowie der vesikuläre Transport entlang der Mikrotubuli gehemmt, was innerhalb von 12 h zur Apoptose führte. In dem semiquantitativen RT-Ansatz konnte ein nicht-signifikantes Schwanken in der Regulation der p4.1 mRNA detektiert werden (Abb. 26c).

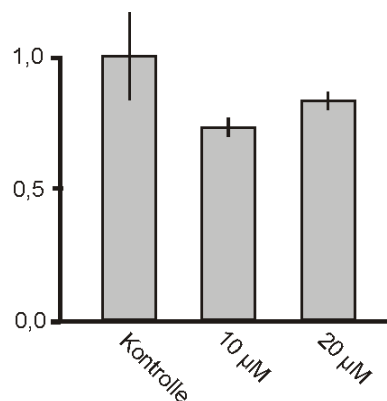
Beide Inkubationen mit Colchicin und Cytochalasin D führten zu apoptotischen Vorgängen, aber nicht zur Herunterregulation der p4.1 - mRNA, wie es durch die Hemmung mit Lovastatin erreicht wurde.

Die Hemmung der HMGCoA-Reduktase durch Lovastatin führt zu einer frühen Blockade im Cholesterinstoffwechsel, dadurch kann zum einen kein Cholesterin mehr gebildet werden, zum anderen stehen keine Isoprenoid-Einheiten zur Verfügung, um z.B. funktionelle GTPasen der Rho-Familie zu bilden. Um festzustellen, ob der Effekt der Herunterregulation der p4.1-immunreaktiven Proteine mit der Hemmung des Isoprenoidseitenweges oder mit der Hemmung der endogenen Cholesterinsynthese der Zelle im Zusammenhang steht, wurde die Geranylgeranyl-Transferase-I (GGT-I) inhibiert. Neurone wurden mit einem GGT-Inhibitor behandelt und nach 24 und 48 h wurden Proteinhomogenate hergestellt. Für die Untersuchung im semiquantitativen RT-Ansatz wurde nach 24 h RNA isoliert. Als Kontrolle dienten unbehandelte Neurone.

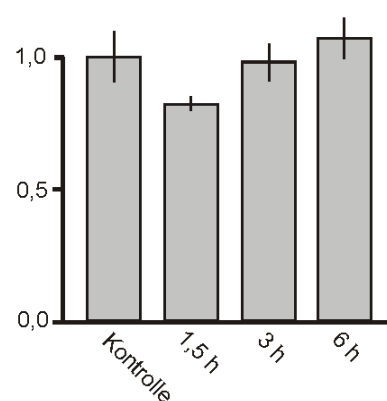
a) Behandlung mit Lovastatin



b) Behandlung mit Cytochalasin D



c) Behandlung mit Colchicin



■ Verhältnis der OD von Protein 4.1 / GAPDH

Abbildung 26: Graphische Auswertung der Ergebnisse der semiquantitativen RT-PCR. In allen Experimenten wurde die optische Dichte der PCR-Amplifikate densitometrisch bestimmt und anschließend auf GAPDH normiert. Dargestellt ist das Verhältnis der optischen Dichten der Banden: Protein 4.1 zu GAPDH des jeweiligen Versuchsansatzes. In a) wurden in verschiedenen Versuchsansätzen Neuronenkulturen mit Lovastatin; Mevalonat; und Lovastatin plus Mevalonat zu Beginn des Experimentes behandelt und nach 24 h Gesamt-RNA isoliert. In weiteren Versuchsansätzen wurden Neurone mit Lovastatin behandelt und 24 h oder 48 h nach der Lovastatingabe Mevalonat zugegeben. Anschließend wurde 24 h nach der Mevalonatzugabe Gesamt RNA isoliert. 1,5 µg Gesamt-RNA wurde revers transkribiert und eine semiquantitative PCR durchgeführt. Eine statistische Auswertung der Daten (n =6) erfolgte mit einem Student's T-Test, der Fehlerbalken stellt den „standard error of mean“ dar. Es ist eine signifikante Herunterregulation der p4.1 mRNA bei der Zugabe von Lovastatin zu erkennen, sowie eine signifikante Hochregulation nach Mevalonatzugabe. Zur Überprüfung der Ergebnisse wurde als Referenzgen Aktin verwendet und dasselbe Ergebnis erhalten (Daten werden nicht gezeigt). GAPDH wurde als Referenzgen verwendet, da in den Ansatz b) das Mikrofilament-System und in Ansatz c) das Mikrotubuli-System der Neurone destabilisiert wurden. In den Versuchsansatz b) und c) konnte zwar ein leichtes Schwanken der p4.1 mRNA nachgewiesen werden, das aber nicht signifikant war.

Die Immunoblotanalyse mit anti - p4.1 Antikörpern ergab eine Herunterregulation der 115 kDa und 130 kDa Proteinbande. Die GGT-I überträgt Geranylgeranyl-Isoprenoide (C20) auf die Thiolgruppe der Aminosäure Cystein am C - Terminus der Proteinsubstrate. Die Hemmung der GGT-I beeinflusst den endogenen Vorrat der Zelle an GTPasen, die für die Signaltransduktionswege (Ras, Rho, Cdc42) notwendig sind. Die Hemmung der GGT-I über einem längeren Zeitraum (48 h) führt zur Apoptose der Neurone, vergleichbar mit der Lovastatin-Behandlung.

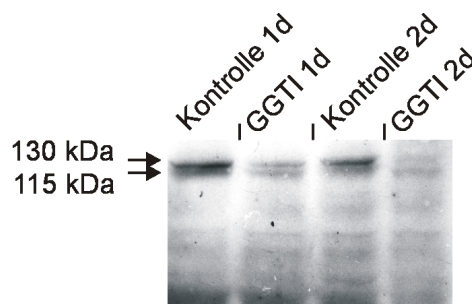


Abbildung 27: Immunoblot einer SDS-PAGE (10%) Trennung, Inkubation mit Primärantikörper H9-85. Proteinhomogenate von Neuronen, die mit einem Inhibitor der GGT-I behandelt wurden, wurden nach 1 und 2 Tagen Inkubationszeit hergestellt. Als Vergleich wurden unbehandelte Neurone verwendet. Zu Erkennen ist die Herunterregulation der 115 kDa und 130 kDa Proteinbande schon nach dem 1. Tag.

Um die Auswirkungen der Herunterregulation der p4.1-immunreaktiven Proteine auf zellulärer Ebene zu detektieren, wurde ein immunzytochemischer Ansatz gewählt. Die Zellkulturen wurden mit einem Antikörper gegen p4.1 und FITC-markiertem Phalloidin gefärbt. In der nachfolgenden Abbildung 28 ist die gleiche Zelle in der p4.1 Färbung (rot), die Darstellung des Mikrofilament-Systems (grün) und die Kolokalisation der beiden Proteine (gelb) dargestellt. In der Kontrolle und der Lovastatin/Mevalonat Behandlung erkennt man eine deutliche Färbung der zellulären Ausläufer, sowie ein starkes Signal im Perikaryon der Zelle. In beiden Behandlungen ist ein gut ausgebildetes Mikrofilament-System der Zelle erkennbar. Das starke Aktin-Signal an einigen Zellfortsätzen deutet auf Wachstumskegel (siehe Pfeil in der Abbildung) hin. Eine Kolokalisation beider Antikörper zeigt sich am Hauptdendriten und entlang des Perikaryons. Das Zytoplasma zeigt eine starke p4.1-immunreaktive Färbung.

Bei der Inhibition der Cholesterinbiosynthese mit Lovastatin konnte nur im Perikaryon der Zelle eine deutliche p4.1-artige Färbung detektiert werden. Die Ausläufer der Zelle zeigten

keine bzw. nur eine sehr schwache Immunreaktivität. Das Mikrofilament-System der Zelle ist im Vergleich zur Kontrolle weniger stark ausgebildet. Zum Teil sind schon Degenerationsvorgänge an den Fortsätzen der Zelle zu erkennen (Pfeilmarkierung). Eine Kolokalisation beider Proteine ist nur im Perikaryon der Zellen zu erkennen. Zu bemerken ist, daß die p4.1-immunreaktiven Proteine aber wesentlich geringer nachweisbar und eher auf das Zytoplasma der Zelle beschränkt sind.

Die Inhibition der GGT-I führt zu dem gleichen Ergebnis wie bei den mit Lovastatin behandelten Zellen. Das Mikrofilament-System der Zelle war im Vergleich zu den mit Lovastatin behandelten Neuronen noch weitgehend intakt, jedoch waren keine Wachstumskegel mehr zu detektieren.

Zusammengefaßt kann man sagen, daß die Inhibition der Geranylgeranyltransferase-I des Neurons zu einer Herunterregulation der p4.1R-immunreaktiven Proteine (110/130 kDa) führt. Weiterhin führt dieser Eingriff in die Cholesterinbiosynthese der Zelle zu einer Reduzierung des neuritischen Netzwerkes und zu Degenerationsvorgängen.

Bei der Niemann Pick Typ C Krankheit liegt eine erblich bedingte Störung des Lipidstoffwechsels vor, bei der Alzheimer'schen Erkrankung führen Mutationen in dem Cholesterintransportprotein Apolipoprotein E zu einer Prädisposition für diese Krankheit. Ein gemeinsames Kennzeichen dieser Krankheiten sind neurodegenerative Vorgänge (das Entstehen der Taupathologie führt im Endstadium zur Bildung von sogenannten Tangles).

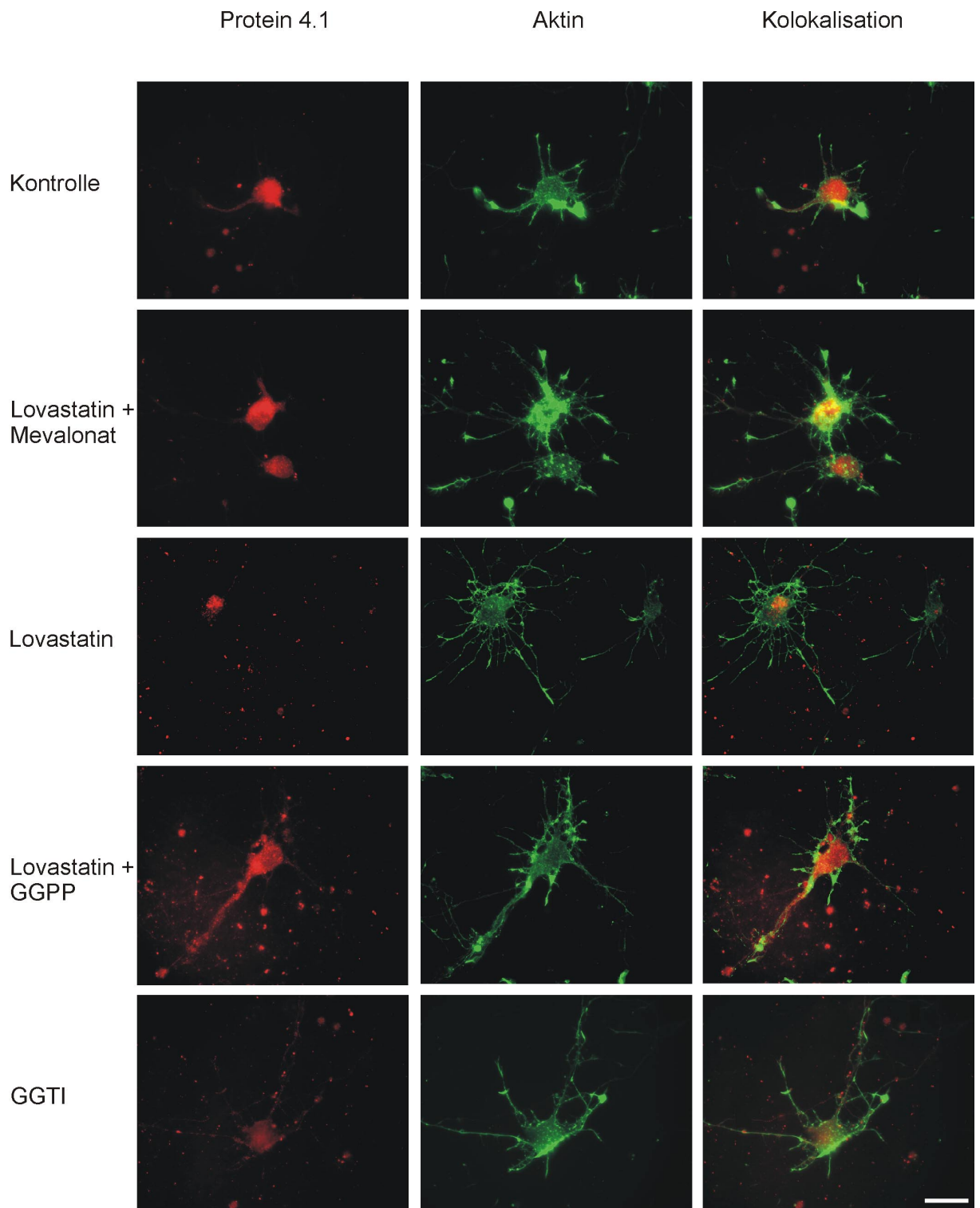


Abbildung 28: Neuronenkulturen wurden 7 Tage auf cholesterinfreiem Medium gehalten und anschließend in verschiedenen Versuchsansätzen wie folgt behandelt: Mit Lovastatin; mit Lovastatin plus Mevalonat; mit GGT-Inhibitor; und mit Lovastatin plus Geranylgeranylpyrophosphat. Die Versuchsansätze Lovastatin, sowie Lovastatin plus Mevalonat wurden nach 48 h mit 4% Paraformaldehyd fixiert. Die Versuchsansätze GGT-Inhibitor, sowie Lovastatin plus Geranylgeranylpyrophosphat wurden nach 24 h mit 4% Paraformaldehyd fixiert. Anschließend wurde die fixierten Neurone mit dem Antiserum H2B6 (p4.1) und FITC-markiertem Phalloidin (grün), eine immunzytochemische Untersuchung durchgeführt. In der Abbildung sind die p4.1 immunreaktiven Proteine rot und das Mikrofilament-System grün dargestellt. Eine Kolokalisation der beiden Proteine ist an der Mischfarbe gelb zu erkennen. Als Kontrolle dienen unbehandelte Neurone. Der Kalibrierungsbalken entspricht 100 μm .

In einem RT-PCR-Ansatz mit neuronalem Gewebe von Alzheimer (n = 4) und pathologisch unauffälligen Patienten (n = 5) wurde untersucht, ob ein Unterschied in der Expression von p4.1R-Isoformen zu detektieren ist. Zu diesem Zweck wurde aus Hippokampi von Kontroll- und Alzheimer-Patienten RNA isoliert und eine RT-PCR durchgeführt. Bei der Verwendung von EPB41 spezifischen Primer der Spleißregion 1 konnte kein Unterschied in der Expression zwischen Gesunden und Alzheimer Patienten gefunden werden. Bei der Verwendung von Klon 9 - spezifischen Primern konnte in den Kontroll - Geweben eine Bande generiert werden, in den pathologischen Geweben konnte hingegen keine oder nur eine sehr schwache Bande detektiert werden (siehe Abbildung 29). In der Abbildung 30 ist in einer Grafik das Verhältnis der optischen Dichte der von Klon 9 generierten zu der optischen Dichte von EPB41 generierten PCR-Amplifikat zwischen Kontrolle (n = 5) und Alzheimer (n = 4) aufgetragen. Der Fehlerbalken drückt den SEM („standard error of mean“) der Versuchsansätze aus. Die Signifikants des Experimentes wurde mit dem Student's T-Test überprüft (Abb. 30).

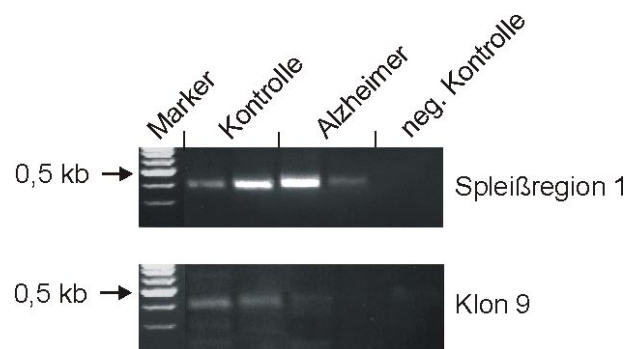
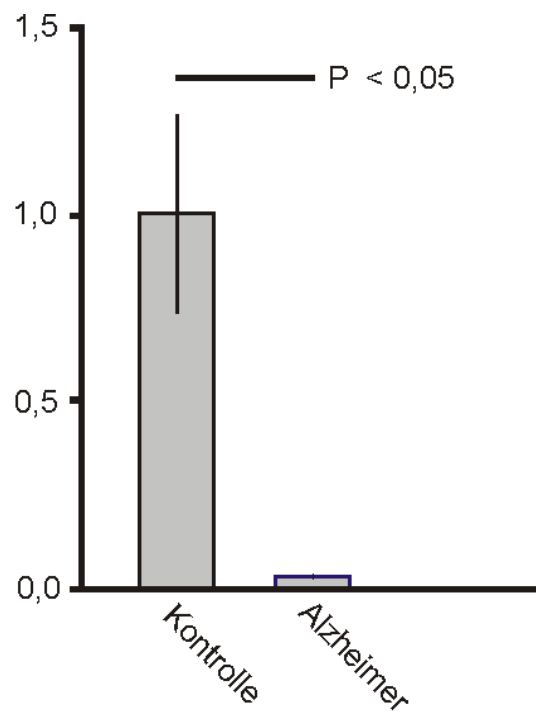


Abbildung 29: Aus den Hippokampi von neurologischen unauffälligen Patienten (n=5) und Alzheimer-Patienten (n=4) wurde Gesamt-RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und eine RT-PCR durchgeführt. Dabei wurden die Primer der Spleißregion 1 (Exon 2-6; pan-EPB41) und Klon 9 - spezifische Primer verwendet. Die Amplifikate wurden auf einem 1,5% Agarosegel aufgetrennt. Dargestellt ist ein typisches RT-PCR Ergebnis.



■ Verhältnis der OD von Klon 9 / Pan-EPB41

Abbildung 30: Aus den Hippokampi von neurologischen unauffälligen Patienten (n = 5) und Alzheimer-Patienten (n = 4) wurde gesamt-RNA isoliert, 1,5 µg der Gesamt-RNA wurde in cDNA umgeschrieben und eine RT-PCR durchgeführt. Dabei wurden pan-EPB41 Primer und Klon 9 - spezifische Primer verwendet. Die optischen Dichten der Banden wurden densitometrisch bestimmt und das Verhältnis Klon 9 zu pan-EPB41 gebildet. Der Fehlerbalken symbolisiert dem SEM der Experimente („standard error of mean“). Die Signifikanz des Experimentes wurde mit einem Student's T-Test überprüft.

4 Diskussion

4.1 Genetische Analyse von Spleißformen des EPB41-Gens

In verschiedenen Arbeiten konnte gezeigt werden, daß in verschiedenen Geweben und Zelllinien mehr als eine p4.1R-Isoform vorhanden ist [Conboy et al., 1988; Conboy et al., 1991; Chasis et al., 1993; Conboy et al., 1993; Krauss et al., 1997; Anderson et al., 1988; Correias, 1991; Granger et al., 1984; Granger et al., 1985]. In Arbeiten von Sihag und Kollegen (1994) und Conboy et al., (1991) wurde die Existenz von niedermolekularen p4.1R-Isoformen in neuronalen Geweben beschrieben. Die p4.1R-Isoformen werden von dem EPB41-Gen (erythrocyte protein band 4.1) exprimiert, das zu der Protein 4.1-Familie gehört.

In der vorliegenden Arbeit wurden Primer verwendet, die nur Spleißformen des EPB41-Gens amplifizieren. Mit spezifischen EBP41 Primern wurde in einem RT-PCR Ansatz die zerebralen Gewebe Hippokampus, Temporal-, Frontal-, Parietal-, Okzipitalkortex und Zerebellum beim Menschen untersucht. Die Analyse der drei bekannten Spleißregionen des EPB41-Gens ergab mehrere generierte Amplifikate, was auf das Vorkommen von verschiedenen Spleißformen schließen läßt. Die generierten Bandenmuster zwischen den einzelnen Geweben zeigten keinen wesentlichen Unterschied untereinander, mit Ausnahme des Zerebellums. In zerebellarem Gewebe konnte ein zusätzliches, höhermolekulares PCR-Amplifikat generiert werden. Dies läßt auf gewebespezifische Spleißereignisse schließen. Die Variation der optischen Dichte der generierten EPB41 - Banden im Vergleich zu dem Aktin-Amplifikat deutet auf eine unterschiedlich starke Expression der p4.1R-Isoformen zwischen den einzelnen Geweben hin.

Von den verschiedenen hirnspezifischen höhermolekularen Spleißformen des EPB41-Gens wurden Klon 9 (EPB41 Δ 3, 4, 5, 16, 17A, 17B) und Klon 13 (EPB41 Δ 3, 17A, 17B) weiter charakterisiert.

4.2 Charakterisierung von Klon 9 und Klon 13

Bei Klon 9 sind die Exons 3, 4, 5, 16, 17A und 17B herausgespleißt. Die Exons 17A und 17B sind bisher nur in Epithel- (Exon 17A) [Schischmanoff et al., 1997] und Muskelgewebe in EPB41 (Exon 17B) Spleißformen gefunden worden [Baklouti et al., 1997; Schischmanoff et al., 1997]. Exon 3 ist ein nicht kodierendes Exon und in allen höhermolekularen EPB41 - Isoformen nicht exprimiert.

Das Fehlen von Exon 16 bedeutet, daß keine Bindung an das Mikrofilament-System der Zelle erfolgen kann, weil die SABD im Protein nicht funktionell ist [Ling et al., 1988]. Gascard et al. (1998) konnten zeigen, daß p4.1R-Isoformen ohne aktive SABD auch an der Plasmamembran lokalisieren, was bedeutet, daß diese Isoformen immer noch die Eigenschaften haben, tertiäre Komplexe mit Membranproteinen zu bilden. Neuere Studien zeigen, daß verschiedene Bindungspartner wie „Nuclear Mitotic Apparatus Protein“ (NuMA) [Mattagajasingh et al., 1999], FKBP13 [Walensky et al., 1998], eIF3-p44 [Hou et al., 2000], Zonula Occludens Protein (ZO)-2 und ZO-1 [Mattagajasingh et al. 2000] an die C-terminale Domäne von p4.1 binden. Es ist zu vermuten, daß bei p4.1R-Isoformen ohne SABD eine weitere Verknüpfung von Proteinen über die C-terminale Domäne erfolgt. Die Bindung von NuMA an das Mikrotubuli-System beruht auf der Interaktion mit Tubulin [Merdes et al., 1996]. Dabei bindet NuMA an das minus-Ende der Mikrotubuli. Pasternack et al. beschrieben 1989 die Beteiligung von p4.1R an der Polymerisation des Mikrotubuli-Systems. Bei dieser Interaktion bindet p4.1R jedoch nicht direkt an die Mikrotubuli. Es wäre möglich, daß hier ein ähnliches Protein wie NuMA die Bindung von p4.1R-Isoformen an die Mikrotubuli vermittelt. Die Plastizität des neuronalen Netzwerkes beruht zum

größten Teil auf der Interaktion zwischen den Mikrofilament- und dem Mikrotubuli-System. Die p4.1-Isoformen könnten bei der Regulation beider Systeme eine Rolle spielen.

Der in der vorliegenden Arbeit analysierte Klon 13 hat die Exons 8-13, Exon 16 und Exon 17 exprimiert. Luque und Correas (2000) konnten zeigen, daß diese Exons für die „core - Region“ kodieren, die bei den niedermolekularen p4.1R-Isoformen (30-80 kDa) für den Kerntransport essentiell sind. Die Expression von Exon 16 wurde zwar als notwendig für die „core - region“ beschrieben, aber eine komplette „core - region“ garantiert nicht automatisch den Kerntransport von niedermolekularen p4.1R-Isoformen (30-80 kDa) [Luque et al., 1998]. Weiterhin konnten Luque und Correas (2000) zeigen, daß Exon 5 und Exon 16 die Lokalisation der Isoformen in den Kern beeinflusst. Wird Exon 5 aber nicht Exon 16 exprimiert, so lokalisiert die p4.1R Isoform ins Zytoplasma der Zelle. Werden beide Exons exprimiert, so findet der Transport in den Kern statt [Gascard et al., 1998]. Interessanterweise konnte diese Arbeitsgruppe in der gleichen Studie zeigen, daß die N-terminale Extensions-Domäne negativ auf den Kerntransport wirkt (diese Domäne ist nur in den höhermolekularen Spleißformen zu detektieren) [Gascard et al., 1998]. Mattagajasingh et al. (1999) zeigten die Interaktion einer 135 kDa p4.1R-Isoform mit NuMA Protein über die N-terminale Extension und die C-terminalen Domäne. Man vermutet, daß NuMA unter anderem eine große Rolle in der Organisation des Spindelapparates am Ende der Mitose spielt. Die Internalisierung von höhermolekularen p4.1R-Isoformen in den Zellkern wird noch durch weitere Proteine beeinflusst und ist nicht nur durch die vorhandenen Domänen der Spleißform bestimmt. Theoretisch wäre bei dem in der vorliegenden Arbeit identifizierten Klon 13 ein Transport in den Kern möglich. Da Neurone postmitotisch sind, wäre statt einer Mitose – assoziierten Funktion eine Funktion bei Spleißvorgängen denkbar, da p4.1R-Isoformen mit dem Spleißfaktor U2AF35 interagieren können [Lallena et al., 1998]. P4.1R-Isoformen können in der Zelle an verschiedenen Orten wie Plasmamembran, Zytoplasma, Zentrosom, Kern, Golgi-Apparat, Streßfasern, Membran „ruffels“ lokalisieren [Krauss et al., 1997; DeCarcer et al., 1995; Krauss et al., 1997; Luque et al., 1998; Correas et al., 1991; Marchesi et al., 1990]. Die unterschiedliche Lokalisation von p4.1R beruht nicht nur auf Spleißvorgängen, sondern ist auch von der posttranslationalen Modifikation des Proteins abhängig (siehe 4.5).

Die FERM Domäne wird durch die Exons 4-12 gebildet. Bisher sind nur von einigen Bindungspartnern die Bindungsmotive auf der FERM Domäne bekannt. Das Herausspleißen von Exons der FERM Domäne hat zur Folge, daß bestimmte Bindungspartner vermutlich nicht mit p4.1 interagieren. Zum Beispiel wird auf Exon 5 das sogenannte LEEDY-Motiv exprimiert, über das die Bindung an AE1 erfolgt [Jöns et al., 1992]. Klon 9 exprimiert dieses Exon nicht und könnte somit nicht an den AE1 binden.

Zu der Gruppe der p4.1 Bindungspartner gehören auch Proteine der MAGUK-Familie, wie z.B. p55, CASK und hDlg. Ihre Bindung erfolgt über das sogenannte p4.1R Bindungsmotiv $S/TX_3(K/R)_4$ {X: beliebige Aminosäure; der Querstrich bedeutet entweder, oder} [Lue et al., 1994; Marfatia et al., 1995; Cohen et al., 1998]. In Neuronen wurden von Kim et al. (1995) und Kornau et al. (1995) eine über die PDZ Domäne vermittelte Bindung von PSD95 und hDlg an den NMDA Rezeptor und Shaker K^+ - Kanälen gezeigt. PSD95 und hDlg binden an p4.1R-Isoformen. Somit wäre eine Assoziation von p4.1R-Isoformen mit dem NMDA-Rezeptor und den Shaker K^+ - Kanälen theoretisch möglich.

Die Funktion der MAGUK-Proteine ist neben der Organisation und Verankerung von Membranproteinen auch die Vermittlung des extrazellulären Signals zu den Signaltransduktionswegen und dem kortikalen Zytoskelett. Bei dieser Aufgabe könnten p4.1R-Isoformen stabilisierend wirken und die Verknüpfung an das Mikrofilament der Zelle bewerkstelligen.

In beiden Klonen ist die vollständige C-terminale Domäne enthalten, mit der eine Interaktion mit NuMA, p4.1-CAP, eIF3-p44 (Untereinheit des eukaryontischen Translationsinitiationsfaktors 3), ZO-1, ZO-2 (Organisation von tight junctions), FKBP13

(ER Chaperone) beschrieben wurde [Mattajagasingh et al., 1999; Walensky et al., 1998; Hung et al., 2000; Mattajagasingh et al., 2000; Hou et al., 2000]. Die unterschiedlichen Bindungspartner verdeutlichen, daß p4.1R-Proteinisoformen an den verschiedenen Stellen in der Zelle lokalisiert sein können. Dabei organisieren vermutlich die p4.1R-Proteinisoformen tertiäre Komplexe wie z.B. zwischen p4.1-Cap und Dynein. In den meisten Fällen werden diese Komplexe mit dem Mikrofilament-System verknüpft. Mit welchem der möglichen Bindungspartner die Interaktion erfolgt, ist von der posttranslationalen Modifikation des Proteins abhängig.

Klon 13 und Klon 9 werden sich wahrscheinlich in ihrer zellulären Funktion unterscheiden. Da bei Klon 13 sämtliche Exons für neuronale Isoformen exprimiert sind, deutet dies auf eine ubiquitäre Rolle im Neuron hin. Mögliche bekannte Funktionen wären die Verknüpfung von Membranproteinkomplexen mit den Mikrofilament-System der Zelle oder intranukleär eine Beteiligung an Spleißvorgängen durch die Interaktion mit U2AF35. Klon 9 müßte eine spezifischere Rolle im Neuron ausüben, da die verkürzte FERM Domäne die Zahl der Interaktionspartner einschränken wird. Weiterhin ist bei Klon 9 die Bildung einer aktiven Spektrin-Aktin Bindungsdomäne nicht möglich, das heißt, Klon 9 kann nicht direkt mit dem Mikrofilament-System der Zelle interagieren. Beide Klone haben eine komplette C-terminale Domäne. Es besteht die Möglichkeit, daß die Interaktion von Proteinen mit der C-terminalen Domäne an Klon 9 eine höhere Affinität hat; da sterische Behinderungen durch eine mögliche Interaktion mit dem Mikrofilament der Zelle in diesem Fall entfällt.

Bei Untersuchungen an Erythroblasten wurde gezeigt, daß sieben p4.1R Hauptisoformen exprimiert werden, die ca. 87% aller p4.1R-Isoformen in der Zelle ausmachen. Davon hatten die von Gascard und Kollegen identifizierte Spleißform EPB41 Δ 3, 14, 15, 17A, 17B einen Anteil von 37% [Gascard et al., 1998]. Dies läßt vermuten, daß im Neuron Klon 13 (EPB41 Δ 3, 17A, 17B) wahrscheinlich zu den stark exprimierten Hauptisoformen gehört. Weiterhin konnte die Gruppe zeigen, daß die höhermolekularen p4.1R-Isoformen mit den herausgespleißten Exons 4 und 5 oder 5 und 16 nur einen Gesamtanteil von 3% aller p4.1R-Isoformen der Zelle haben. Dies läßt vermuten, daß Klon 9 wahrscheinlich eine sehr niedrig exprimierte Isoform ist.

4.3 Die zelluläre Verteilung der EPB41 - Spleißformen im humanen Hippokampus

In der In-situ-Hybridisierung mit Sonden, die sämtliche EPB41 - Spleißformen (pan-EPB41) detektieren, konnte an hippokampalem Gewebe eine Exprimierung in Zellen der granulären Schicht der Fascia dentata, sowie in fast allen Pyramidenneuronen der CA-Regionen nachgewiesen werden. Die Pyramidenneurone variierten in der Signalintensität zwischen den einzelnen Regionen. Bei gleicher Entwicklungsdauer konnte mit einer Klon 9-spezifischen Sonde nur eine schwächere Signalintensität im Vergleich zu der pan-EPB41 Sonde festgestellt werden. Dieser Befund steht im Gegensatz zu den Ergebnissen von Walensky et al. (1999), Parra et al. (2000), die in Maus für Isoformen des EPB41-Gens im Hippokampus nur eine Expression in der granulären Schicht der Fascia dentata beschrieben haben. Dies deutet auf einen möglichen speziesspezifischen Unterschied hin. Das Expressionsmuster von humanen EPB41 - Spleißformen gleicht der beschriebenen Expression von EPB41N - Spleißformen bei der Maus. Eine Kreuzreaktion mit Spleißformen des EPB41N - Gens kann jedoch ausgeschlossen werden, da die EPB41 - Sonden aus einer Region gewählt wurde, die keine Homologie zwischen den Mitgliedern der p4.1-Familie aufweist.

4.4 Proteinbiochemische Charakterisierung der p4.1R-Proteinisoformen

Die immunhistochemischen Untersuchungen mit polyklonalen anti-p4.1R Antikörpern bestätigen die Ergebnisse der In-situ-Hybridisierung. Es wurden vorwiegend neuronale Zellen gefärbt. Die granuläre Anfärbung der Neurone markiert das Perikaryon und die Dendriten. In keinem der untersuchten Fälle konnte eine axonale Färbung nachgewiesen werden. Die granuläre Anfärbung könnte auf lokale Kluster der immunreaktiven Proteine an den Membranen der Zelle hinweisen.

Bei der Fraktionsanalyse konnten nur im 100.000 g Pellet, das sämtliche Membranen der Zelle mit den assoziierten Proteinen enthielt, die p4.1R-immunreaktiven Proteinbanden von 110 kDa und 120 kDa detektiert werden. Im Überstand wurden diese Banden nicht nachgewiesen. Beide Ergebnisse lassen auf eine Interaktion der p4.1R-Isoformen mit Membranproteinen der Zelle schließen. Bei Untersuchungen des visuellen Kortex der Ratte mit einem Antikörper gegen erythrozytären p4.1 beschrieb Tsumoto et al. (1988) eine ähnliche neuronale Färbung.

Sihag et al. (1994) beschrieb p4.1R-Isoformen in humanen, zerebralen Geweben mit einem Molekulargewicht von 50 kDa und 68 kDa. In der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Immunoblotanalyse an humanen zerebralen Geweben konnten in Hippokampus, Temporalkortex und Zerebellum p4.1R-immunreaktive Proteine mit einem Molekulargewicht von 80 kDa, 110 kDa und 120 kDa nachgewiesen werden. Hingegen konnten höhermolekularen immunreaktiven Proteinen mit einem Molekulargewicht von 110 kDa und 120 kDa bei Untersuchungen von Niere, Leber, Skelettmuskel, Herz und Blut nicht detektiert werden. Bisher wurden in keiner Studie an humanen, zerebralen Geweben die 110 kDa und 120 kDa p4.1 immunreaktiven Proteinbanden gezeigt. Die 110 kDa und 120 kDa Proteinbanden konnten mit einem Klon 9-spezifischen Antikörper detektiert werden. Ein möglicher Grund für die Detektion von zwei immunreaktiven Proteinbanden könnte an verschiedenen posttranslationalen Modifikationen des Proteins liegen. Eine andere Möglichkeit wäre, daß die unterschiedliche Proteinbanden auf „Klon 9 Isoformen“ hindeuten, die sich in den Spleißregionen 2 und/oder 3 unterscheiden, da der Antikörper gegen ein acht Aminosäuren langes Peptid der Spleißstelle 1 (Exon 2, 6; siehe Tabelle 4) generiert wurde. Da mit dem Antikörper H9-85 keine höhermolekularen immunreaktiven Proteine außer der 110 kDa und 120 kDa Proteinbande nachgewiesen werden konnte, ist zu vermuten, daß Klon 13 - Proteinisoformen ein Molekulargewicht von 110 kDa und 120 kDa haben könnten. Aus Temporalkortex wurde mittels einer Mikrostanze graue und weiße Substanz isoliert und die Proteine in einer Immunoblotanalyse untersucht. Nur in der grauen Substanz konnten die 110 kDa und 120 kDa p4.1R-immunreaktiven Proteine nachgewiesen werden. In dieser Substanz sind vor allem Neurone angesiedelt. Die weiße Substanz besteht zum größten Teil aus glialen Zellen, vereinzelt Neuronen und aus den axonalen Ausläufern der Neurone der grauen Substanz. Dieser Befund der Fraktionsanalyse bestätigt das erhaltene Bild in der immunhistochemischen Analyse. In der immunhistochemischen Färbung wurden Neurone des Iso- und Allokokortex angefärbt. Die immunreaktiven Neurone zeigten eine starke punktuirierte Färbung von Soma und Dendriten.

Bisher wurde ein p4.1N-immunreaktives Protein mit einem Molekulargewicht von 135 kDa nachgewiesen. Die 97 kDa und 144 kDa schweren p4.1G-Proteinisoformen wurden im Gehirn vorwiegend in Gliazellen nachgewiesen. Proteinisoformen von p4.1B mit einem Molekulargewicht von 124/130 kDa und 144/148 kDa sind nur in bestimmten Zellpopulationen wie z.B. den Pyramidenzellen der CA-Region, Purkinjezellen des Zerebellums exprimiert und lassen sich an Zell-Zell-Kontaktstellen nachweisen [Parra et al., 2000]. Die in der vorliegenden Arbeit gefundenen Proteine stimmen somit nicht mit den in der Maus beschriebenen Isoformen für p4.1N, p4.1G und p4.1B überein, was für einen p4.1R spezifischen Antikörper zu erwarten ist.

In Ratte wurden p4.1N-Proteinisoformen mit einem Molekulargewicht von 110 kDa und 125 kDa, p4.1B-Proteinisoformen mit einem Molekulargewicht von 130 kDa und p4.1R-Proteinisoformen mit einem Molekulargewicht von 120 kDa beschrieben [Yamakawa et al., 2000; Yamakawa et al., 1999; Ohara et al., 1999; Tsumoto et al., 1988]. Mit den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Antikörper wurden in Hirnhomogenaten von Ratte p4.1R-Isoformen von 80 kDa, 115 kDa und 135 kDa detektiert. Die Analyse einer Neuronenkultur zeigte p4.1R-immunreaktive Banden mit einem Molekulargewicht von 50 kDa, 80 kDa, 115 kDa und 130 kDa. Auch in diesem Fall unterscheiden sich die p4.1R-Isoformen.

Hauptunterschied zum Menschen ist zum einen das unterschiedliche Molekulargewicht der p4.1R-immunreaktiven Proteinbanden von 115 kDa und 130 kDa. Zum anderen konnte die 115 kDa und 130 kDa Proteinbande sowohl im 100.000 g Pellet, als auch im Überstand nachgewiesen werden. Dies läßt auf einen speziesspezifischen Unterschied der p4.1R-Isoformen schließen.

4.5 Funktionelle Regulation von Protein 4.1R-Isoformen

P4.1R-Isoformen konnten in der Zelle an verschiedenen Orten wie Plasmamembran, Zytoplasma, Zentrosom, Kern, Golgi-Apparat, Streßfasern, Membran „ruffels“ lokalisiert werden [Krauss et al., 1997; DeCarcer et al., 1995; Krauss et al., 1997; Luque et al., 1998; Correias et al., 1991; Marchesi et al., 1990]. Die unterschiedliche Lokalisation von p4.1R beruht jedoch nicht nur auf Spleißvorgängen, sondern ist auch von der posttranslationalen Modifikation des Proteins abhängig [Gascard et al., 1998].

Eine mögliche funktionelle Regulation von p4.1 erfolgt über die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration und Calmodulin. Beide in der vorliegenden Arbeit identifizierten Klone haben Calmodulinbindungsstellen, eine Ca^{2+} -abhängige auf Exon 9 und eine Ca^{2+} -unabhängige auf Exon 11. In verschiedenen Studien konnte die Regulation der Bindungsaffinität von p4.1R-Isoformen durch den Einstrom von Ca^{2+} -Ionen gezeigt werden [Lombardo and Low, 1994; Nunomura et al., 2000; Takakuwa and Mohandas, 1988]. Die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration führte zu einer Konformationsänderung des p4.1R Moleküls, was zum Ablösen von dem Bindungspartner führt. Nunomura und Mitarbeiter erstellten folgendes Regulationsmodell für den CD44 Rezeptor: An CD44 können die Proteine Ankyrin und p4.1R an unterschiedlichen Stellen binden. Bei einer niedrigen intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration bindet p4.1R an den Rezeptor, Ankyrin jedoch nicht. Erhöht sich die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration durch Ca^{2+} -Einstrom, dissoziiert p4.1R ab und Ankyrin bindet an den Rezeptor. Interessanterweise bewirkt der Wechsel der Bindungspartner eine Konformationsänderung am CD44 Rezeptor, der dadurch in die aktive Form übergeht. Eine solche Calcium - abhängige Regulation könnte auch für Klon 9 und Klon 13 möglich sein.

Eine andere Möglichkeit der Regulation von p4.1R Proteinen könnte durch Phosphorylierung erfolgen. P4.1R kann durch verschiedene Kinasen (z.B. Proteinkinasen C und A) phosphoryliert werden [Cohen et al., 1992]. Die Phosphorylierungsstelle ist an Ser-331 in der 16 kDa Domäne und Ser-467 in der SABD [Horne et al., 1990]. Eine Phosphorylierung der SABD bewirkt zum einen eine Abnahme der Bindungsaffinität von p4.1R an Spektrin und Aktin und zum anderen eine Inhibition der Bildung des tertiären Komplexes zwischen Aktin, Spektrin und p4.1R [Ling et al., 1988].

In verschiedenen Studien wurde die Regulation von Proteinen der ERM-Familie durch den Rho - abhängigen Signaltransduktionsweg beschrieben [Kotani et al., 1997; Tsukita et al., 1997a; Tsukita et al., 1997b; Hirao et al., 1996; Vaheri et al., 1997]. Die Aktivierung des Rho - Signaltransduktionsweges führt zur Aktivierung von Serin/Threonin Kinasen. Diese

phosphorylieren inaktive ERM-Proteine im Zytoplasma. Die aktivierten ERM-Proteine können daraufhin an der Plasmamembran in tertiären Komplexen zwischen Membran-, ERM-Proteinen und Mikrofilament nachgewiesen werden [Mackay et al., 1998]. Am besten ist die Phosphorylierungs - abhängige Interaktion von Proteinen der ERM-Familie wiederum mit dem CD44 Rezeptor untersucht. Die ERM-Proteine liegen als inaktive Form im Zytoplasma der Zelle vor. Die inaktive Form beruht auf einer intramolekularen Faltung der FERM Domäne mit der C-terminalen Domäne [Gary et al., 1995]. Die Phosphorylierung des Proteins bewirkt eine Konformationsänderung in der FERM Domäne. Dies führt zum Auffalten und somit zur aktiven Form des Proteins [Gary et al., 1995; Bretscher et al., 1995; Pearson et al., 2000]. Die Bindung von ERM-Proteinen an den CD44 Rezeptor wird durch Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat und durch das GTP-bindende Protein Rho reguliert [Kotani et al., 1997; Hirao et al., 1996]. Dabei bildet sich ein tertiärer Komplex zwischen ERM-Protein, CD44 und Rho-GTPase aus. Eine analoge Aktivierung der ERM-Proteine ist auch für den Rac - Signalweg nachgewiesen worden [Mackay et al., 1998]. Die Inaktivierung dieser Komplexe erfolgt durch Dephosphorylierung der ERM-Proteine. Durch die große Homologie der FERM Domäne und der nahen Verwandtschaft der p4.1-Familie mit der ERM-Familie ist eine ähnliche Regulation der p4.1R-Proteinisoformen durch den Rho-Signaltransduktionsweg zu vermuten.

Mitglieder der Rho-Familie der „kleinen GTPasen“ sind Rac, Cdc42 und RhoA. Sie spielen eine wichtige Rolle in Signaltransduktionswegen, bei denen ein extrazelluläres Signal auf die Morphologie von Zellen wirkt [Narumiya et al., 1996; Hall, 1998; Van Aelst et al., 1997]. Bei diesen morphologischen Veränderungen wirken die Rho - GTPasen auf die Regulation des Zytoskeletts. In Studien an kultivierten Neuronen konnte eine regulierende Funktion der Rho-Familie an Wachstumsprozessen von neuronalen Zellfortsätzen nachgewiesen werden [Van Aelst et al., 1997; Leeuwen et al., 1997; Gebbink et al., 1997]. Threadgrill et al. (1997) und Li et al. (2000) konnte eine Rolle der Rho - GTPasen bei der Regulation des Dendritenbaumwachstums und der Plastizität des Dendritenbaums zeigen. Die GTPasen der Rho-Familie regulieren durch extrazelluläre Stimuli (z.B. Neurotrophine) die Wachstumsrichtung des Dendriten [Kuhn et al., 1998; McAllister et al., 1995].

Für die Synthese der funktionellen GTPasen der Ras-Superfamilie ist die posttranslationale Isoprenylierung ein entscheidender Schritt. Diese Protein-Isoprenylierung erfolgt in der Zelle durch die Farnesyltransferase, die Geranylgeranyltransferase (GGT)-I und die GGT-II. Diese Haushaltsproteine übertragen Farnesyl - (C15) oder Geranylgeranyl - (C20) Isoprenoide, die aus dem Cholesterinstoffwechsel stammen, auf die Thiolgruppe des Cysteins am C-Terminus des Proteinsubstrates [Gibbs et al., 1994; Oliff, 1999]. Die posttranslationale Modifikation der Rho-Proteine erfolgt durch die GGT-I [Prendergast et al., 2000].

In der vorliegenden Arbeit wurden Neurone in cholesterinfreiem Medium gehalten und damit die endogene Cholesterinbiosynthese aktiviert. Anschließend wurde die endogene Cholesterinbiosynthese durch Inhibition der HMGCoA Reduktase mit Lovastatin unterbunden. In einem zweiten Versuchsansatz wurde die GGT-I inhibiert. Dies hatte zur Folge, daß der funktionelle Pool an GTPasen der Rho-Familie reduziert wurde. In der immunzytochemischen Untersuchung der Neurone waren nach Inhibition der HMGCoA Reduktase und der GGT-I p4.1-immunreaktive Proteine im Neuron nur noch schwach nachweisbar. In den meisten Fällen waren die Proteine nicht mehr in den Dendriten der Neurone zu detektieren, im Vergleich zu den unbehandelten Zellen war zudem die Färbung des Perikaryons deutlich schwächer. Dies deutet auf eine Herunterregulation der p4.1-immunreaktiven Proteine. Das Netzwerk der neuronalen Zellfortsätze war schlechter ausgebildet, das heißt, die Ausläufer der Neurone waren im Vergleich zu den unbehandelten Zellen stark verkürzt und geringer verzweigt.

Die Verarmung des Pools an funktionellen GTPasen der Rho-Familie führte zu einer Herunterregulation der p4.1 mRNA (Semiquantitative RT-PCR), und der 110 und 130 kDa immunreaktiven p4.1-Isoformen. Bei Neuronen, die mit Lovastatin behandelt wurden und nach 24 h oder 48 h Mevalonat erhielten (Produkt der HMGCoA Reduktase), konnte eine Hochregulation der p4.1 mRNA nachgewiesen werden. Die Destabilisierung des Mikrofilament-Systems oder des Mikrotubuli-Systems des Neurons führte jedoch nicht zu einer Herunterregulation der p4.1 mRNA. Dies deutet daraufhin, daß die Regulation der p4.1 mRNA nicht durch Zytoskelettkomponente erfolgt, sowie nicht im Zuge eines apoptotischen Vorganges erfolgte. Daraus läßt sich eine mögliche Regulation der p4.1R-Proteinisoformen durch die Proteine der Rho-Familie, sowie eine Regulation von p4.1R in den Signaltransduktionswegen der Rho-Familie postulieren. Die GTPasen der Rho-Familie spielen in der Plastizität des dendritischen Netzwerkes eine wichtige Rolle. Da p4.1R-Proteinisoformen Membranproteine mit dem Mikrofilament verknüpfen, könnte die Regulation des Mikrofilament-Systems durch die GTPasen der Rho-Familie unter anderem durch die Regulation der p4.1R-Proteinisoformen erfolgen.

4.6 Die Rolle von von Protein 4.1R-Proteinisoformen in verschiedenen Krankheiten

Mutationen oder Deletionen im EPB41-Gen haben in verschiedenen Zellen dramatische Auswirkungen. Rousseaux-Prevos und Mitarbeiter zeigten bei unfruchtbaren Männern, daß die Deformation der Spermienköpfe auf das Fehlen von niedermolekularen p4.1R-Isoformen zurückzuführen ist. Ursache dieses Defekts war eine Mutation in der zweiten Translationsinitiationsstelle in Exon 4.

Die Fehlfunktion von p4.1R bei der vererbaren Elliptocytose führt zur Bildung von deformierten Erythrozyten mit instabilen Membranen [Tchernia et al., 1988; Agre et al., 1982; Palek and Lambert, 1990; Palek and Sahr, 1992].

Bei Psoriasis vulgaris wurde bei Untersuchungen der Keratinozyten eine zusätzliche 45 kDa p4.1-immunreaktive Proteinbande gefunden [Shimizu et al., 1995].

Das Fehlen von sämtlichen EPB41 - Isoformen im Gehirn von knock out Mäusen führt zu motorischen Störungen und Verhaltensauffälligkeiten. Die Mäuse brauchten wesentlich länger um Aufgaben zu lösen als die Wildtypkontrollen [Shi et al., 1999; Walensky et al., 1998]. Eine wichtige Rolle bei Lernprozessen spielt die granuläre Schicht der Fascia dentata. In diesen Zellen werden Isoformen von EPB41 und EPB41N exprimiert. Das Auftreten der Störung in den knock out Mäusen deutet daraufhin, daß die Proteinisoformen der beiden Gene EPB41 und EPB41N unterschiedliche Aufgaben in der Zelle haben, die nicht durch die Isoformen des anderen Gens substituiert werden können.

Peles et al. (1997) zeigten die Interaktion von Contactin mit Neurexin IV, an das p4.1R-Isoformen binden können. Contactin wird durch ein Neurotrophin aktiviert und steuert so das Auswachsen und die Plastizität von Neuriten. An den NMDA Rezeptor können die p4.1-Interaktionspartner hDlg und PSD95 binden. Die GTPase RhoA der Rho-Familie vermittelt die normale Entwicklung und die Stabilität des Dendritenbaumes bei aktivierten NMDA Rezeptoren. In der vorliegenden Arbeit ist ein Zusammenhang zwischen den Proteinen der Rho-Familie und p4.1R-Isoformen gezeigt worden. Daraus läßt sich eine mögliche Beteiligung von p4.1R-Isoformen an der Plastizität des Dendritenbaumes annehmen. Eine verminderte Plastizität der Neurone der granulären Schicht der Fascia dentata hätte einen Einfluß auf die Gedächtnisbildung. Ebenso würde eine geringere Verzweigung der Neurone der granulären Schicht des Zerebellums eine mögliche Erklärung für die motorischen Störungen der p4.1R knock-out Mäuse sein.

Eine Störung des Cholesterinstoffwechsel wurde auch bei der Alzheimer'schen Erkrankung sowie bei Niemann Pick Typ C nachgewiesen. Bei diesen Krankheiten kommt

es zu Zytoskelettveränderungen im Rahmen von neurodegenerativen Vorgängen. Ein Grund für die Neurodegeneration ist das Entstehen der Tau-Pathologie, die im Endstadium zur Bildung von sogenannten Tangles führt. In proteinbiochemischen Untersuchungen ist kein Unterschied zwischen einem Niemann-Pick und einem Alzheimer Tangle festzustellen. Die Tangles bestehen aus aggregiertem Tau-Protein. Sihag et al. (1994) konnte p4.1-Isoformen an diesen intra-neuronalen Zytoskelettanomalitäten, den sogenannten neurofibrillären Tangles, nachweisen.

In der vorliegenden Arbeit konnte in einer vorläufigen RT-PCR Studie an Hippokampi von Kontrollen und Alzheimer Patienten eine selektive Herunterregulation der mRNA von Klon 9 gezeigt werden. Beide Befunde könnten auf eine Beteiligung von p4.1R-Isoformen an den neuronalen Degenerationsvorgängen bei der Alzheimer'schen Erkrankung hindeuten.

Ausblick

Die Funktion der Proteinisoformen des EPB41-Gens im Neuron sind bisher noch nicht bekannt. Geplant sind Untersuchungen zur Lokalisation und Funktion der klonierten p4.1R-Isoformen in verschiedenen Zellsystemen, sowie Untersuchungen zur Rolle von p4.1R-Isoformen in neurodegenerativen Prozessen.

Literaturverzeichnis

- Agre P., Orringer E.P., Bennett V.: Deficient red-cell spectrin in severe, recessively inherited spherocytosis. *N. Engl. J. Med.* Band 306. 1982, S.115-1161,
- Allan V.J., Kreis T.E.: A microtubule-binding protein associated with membranes of the golgi apparatus. *J. Cell Biol.* Band 103. 1986, S.2229-2239,
- Anderson R.A., Marchesi V.T.: Regulation of the association of membrane skeletal protein 4.1 with glycophorin by a polyphosphoinositide. *Nature.* Band 318. 1985, S.295-298,
- Anderson J.M.: Cell signalling: MAGUK magic. *Curr. Biol.* Band 6. 1996, S.382-384,
- Baumgartner S., Littelton J.T., Bhat M.A., Harbecke R., Lengyel J.A., Ehrismann C.R., Prokop A., Bellen H.J.: A Drosophila neurexin is required for septate junction and blood-nerve barrier formation and function. *J. Cell Biol.* Band 87. 1996, S.1059-1068,
- Baklouti F., Huang S.C., Vulliamy T.J., Delaunay J., Benz E.J. Jr.: Organization of the human protein 4.1 genomic locus: new insights into the tissue-specific alternative splicing of the pre-mRNA. *Genomics.* Band 39. 1997, S.289-302,
- Bretscher A., Gary R., Berryman M.: Soluble ezrin purified from placenta exists as stable monomers and elongated dimers with masked C-terminal ezrin-radixin-moesin association domains. *Biochemistry.* Band 34. 1995, S.16830-16837,
- Chasis J.A., Coulombel L., Conboy J., McGee S., Andrews K., Kan Y.W., Mohandas N.: Differentiation-associated switches in protein 4.1 expression. Synthesis of multiple structural isoforms during normal human erythropoiesis. *J. Clin. Invest.* Band 91. S.329-338,
- Chishti A.H., Kim A.C., Marfatia S.M., Lutchman M., Hanspal M., Jindal H., Liu S.C., Low P.S., Rouleau G.A., Mohandas N., Chasis J.A., Conboy J.G., Gascard P., Takakuwa Y., Huang S.C., Benz E.J. Jr, Bretscher A., Fehon R.G., Gusella J.F., Ramesh V., Solomon F., Marchesi V.T., Tsukita S., Tsukita S., Arpin M., Louvard D., Tonks N.K., Anderson J.M., Fanning A.S., Bryant P.J., Woods D.F., Hoover K.B.: The FERM domain: a unique module involved in the linkage of cytoplasmic proteins to the membrane. *Trends Biochem. Sci.* Band 23. 1998, S.281-282,
- Carey D.J.: Syndecans: multifunctional cell-surface co-receptors. *Biochem J.* Band 327. 1997, S.1997,
- Cohen C.M., Gascard P.: Regulation and post-translational modification of erythrocyte membrane and membrane-skeletal proteins. *Semin. Hematol.* Band 92. 1992, S.244-293,
- Cohen A.R., Wood D.F., Marfatia S.M., Walter Z., Chishti A.H., Anderson J.M.: Human CASK/LIN-2 binds syndecan-2 and protein 4.1 and localizes to the basolateral membrane of epithelial cells. *J. Cell Biol.* Band 142. 1998, S.129-138,
- Conboy J.: The role of alternative pre-mRNA splicing in regulating the structure and function of skeletal protein 4.1. *P.S.E.B.M.* Band 220. 1999, S.73-78,
- Conboy J.G., Chan J.Y., Chasis J.A., Kan Y.W., Mohandas N.: Tissue- and development-specific alternative RNA splicing regulates expression of multiple isoforms of erythroid membrane protein 4.1. *J. Biol. Chem.* Band 266. 1991, S.8273-8280,

- Conboy J.G., Chan J., Mohandas N., Kan Y.W.: Multiple protein 4.1 isoforms produced by alternative splicing in human erythroid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* Band 85. 1988, S.9062-9065,
- Correas I.: Characterization of isoforms of protein 4.1 present in the nucleus. *Biochem J.* Band 261. 1991, S.581,
- Correas I., Speicher D.W., Marchesi V.T.: Structure of the spectrin-actin binding site of erythrocyte protein 4.1. *J. Biol. Chem.* Band 261. 1986, S.13362-13366,
- Cutts J.L., Melnykovych G.: Defective utilization of cholesterol esters from low-density lipoprotein in a human acute lymphoblastic leukemia T cell line. *Biochim. Biophys. Acta.* Band 961. 1988, S.65-72,
- Dabora S.L., Sheetz M.P.: The microtubule – dependent formation of a tubulovesicular network with characteristics of the ER from cultured cell extracts. *Cell.* Band 54. 1988, S.27-35,
- DeCarcner G., Lallena M.J., Correas I.: Protein 4.1 is a component of the nuclear matrix of mammalian cells. *Biochem J.* Band 312. 1995, S.871,
- Drenckhahn D., Jöns T., Schmitz F.: Production of polyclonal antibodies against proteins and peptides. *Met. Cell Biol.* Band 37. 1993, S.7-56,
- Fehon R.G., Dawson I.A., Artavanis-Tsakonas S.: A Drosophila homologue of membrane-skeleton protein 4.1 is associated with septate junctions and is encoded by the coracle gene. *Development.* Band 120. 1994, S.545-557,
- Gary R. and Bretscher A.: Ezrin self-association involves binding of N-terminal domain to a normally masked C-terminal domain that includes the F-actin binding site. *Mol. Biol. Cell.* Band 6. 1995, S.1061-1075,
- Gascard P., Lee G., Coulombel L., Auffray I., Lum M., Parra M., Conboy J.G., Mohandas N., Chasis J.A.: Characterization of multiple isoforms of protein 4.1R expressed during erythroid terminal differentiation. *Blood.* Band 92. 1998, S.4404-4414,
- Gebbink M.L., Kranenburg O., Poland M., van Horck F.P., Houssa B., Moolenaar W.H.: Identification of a novel putative Rho-specific GDP/GTP exchange factor and a Rho A-binding protein. Control of neuronal morphology. *J. Cell Bio.* Band 137. 1997, S.1603-1613,
- Gibbs J., Oliff A., Kohl N.E.: Farnesyltransferase inhibitors: Ras research yields a potential cancer therapeutic. *Cell.* Band 77. 1994, S.175-178,
- Girault J.A., Labesse G., Mornon J.P., Callebaut I.: The N-termini of FAK and JAKs contain divergent band 4.1 domains. *Trends Biochem. Sci.* Band 24. 1999, S.54-57,
- Granger B.L., Lazarides E.: Appearance of new variants of membrane skeletal protein 4.1 during terminal differentiation of avian erythroid and lenticular cells. *Nature.* Band 313. 1985, S.238-241,
- Granger B.L., Lazarides E.: Membrane skeletal protein 4.1 of avian erythrocytes is composed of multiple variants that exhibit tissue-specific expression. *Cell.* Band 37. 1984, S.595-607,
- Hall A.: Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science.* Band 279. 1998, S.509-514,
- Hemming N.J., Anstee D.J., Mawby W.J., Reid M.E., Tanner M.J.A.: Localization of the protein 4.1-binding site on human erythrocyte glycoporphins C and D. *Biochem J.* Band 299. 1994, S.191-196,

- Hirao M., Sarto N., Kondo T., Yonemura S., Monden M., Sasaki T., Tsukita S.: Regulation mechanism of ERM (ezrin/radixin/moesin) protein/plasma membrane association: possible involvement of phosphatidylinositol turnover and Rho-dependent signalling pathway. *J. Cell Biol.* Band 135. 1996, S.37-51,
- Horne W.C., Huang S.C., Becker P.S., Tang T.K., Benz E.J. Jr.: Tissue-specific alternative splicing of protein 4.1 inserts an exon necessary for formation of the ternary complex with erythrocyte spectrin and F-actin. *Blood.* Band 82. 1993, S.2558-2563,
- Horne W.C., Prinz W.C., Tang E.K.-Y: Identification of two cAMP dependent phosphorylation sites on erythrocyte protein 4.1. *Biochim. Biophys. Acta.* Band 1055. 1990, S.87-92,
- Hou C.-L., Tang C.-J.C., Roffler S.R., Tang T.K.: Protein 4.1R binding to eIF3-p44 suggest an interaction between cytoskeletal network and the translational apparatus. *Blood.* Band 96. 2000, S.747-753,
- Hough C.D., Woods D.F., Park S., Bryant P.J.: Organizing a functional junctional complex requires specific domains of the Drosophila MAGUK discs large. *Genes Dev.* Band 11. 1997, S.3242-3253,
- Hoover K.B., Bryant P.J.: The genetics of the protein 4.1 family: organizers of the membrane and cytoskeleton. *Curr. Opin. Cell Biol.* Band 12. 2000, S.229-234,
- Huang J.P., Tang C.J., Kou G.H., Marchesi V.T., Benz E.J. Jr, Tang T.K.: Genomic structure of the locus encoding protein 4.1. Structural basis for complex combinational patterns of tissue-specific alternative RNA splicing. *J. Biol. Chem.* Band 268. 1993, S.3758-3766,
- Hung L.Y., Tang C.J., Tang T.K.: Protein 4.1 R-135 interacts with a novel centrosomal protein (CPAP) which is associated with the gamma-tubulin complex. *Mol. Cell. Biol.* Band 20. 2000, S.7813-7825,
- Incardona J.P. and Eaton S.: Cholesterol in signal transduction. *Curr. Opin. Cell Biol.* Band 12. 2000, S.193-203,
- Jöns T., Drenckhahn D.: Identification of binding interface involved in linkage of cytoskeletal protein 4.1 to the erythrocyte anion exchanger. *EMBO J.* Band 11. 1992, S.2863-2867,
- Kelly G.M., Zelus B.D., Moon R.T.: Identification of a calcium-dependent calmodulin-binding domain in Xenopus membrane skeleton protein 4.1. *J. Biol. Chem.* Band 266. 1991, S.12469-12473,
- Kim A.C., Van Huffel C., Lutchman M., Chishti A.H.: Radiation hybrid mapping of EPB41L1, a novel protein 4.1 homologue, to human chromosome 20q11.2-q12. *Genomics.* Band 49. 1998, S.165-166,
- Kim E. et al.: Clustering of Shaker-type K1 channel by interaction with a family of membrane-associated guanylate kinases. *Nature.* Band 478. 1995, S.85-88,
- Kondo T., Takeuchi K., Doi Y., Yonemura S., Nagata S., Tsukita S., Tsukita S.: ERM (ezrin/radixin/moesin)-based molecular mechanism of microvillar breakdown at an early stage of apoptosis. *J. Biol. Cell.* Band 139. 1997, S.749-758,
- Kornau H.C. et al.: Domain interaction between NMDA receptor subunits and postsynaptic density protein PSD-95. *Science.* Band 269. 1995, S.1737-1740,

- Kotani H., Takaishi K., Sasaki T., Takai Y.: Rho regulates association of both ERM family and vinculin with plasma membrane in MDCK cells. *Oncogene*. Band 14. 1997, S.1705-1713,
- Krapivinsky G.B., Ackermann M.J., Gordon E.A., Krapivinsky L.D., Clapham D.E.: Molecular characterization of a swelling-induced chloride conductance regulatory protein, pICln. *Cell*. Band 76. 1994, S.439,
- Krauss S.W., Chasis J.A., Rogers C., Mohandas N., Krockmalnic G., Penman S.: Structural protein 4.1 is located in mammalian centrosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Band 94. 1997, S.7297-7302,
- Krauss S.W., Larabell C.A., Lockett S., Gasvard P., Penman S., Mohandas N., Chasis J.A.: Structural protein 4.1 in the nucleus of human cells: Dynamic rearrangement during cell division. *J. Cell Biol.* Band 137. 1997, S.275-289,
- Lallena M.J., Martinez C., Valcarcel J., Correas I.: Functional association of nuclear protein 4.1 with pre-mRNA splicing factors. *J. Cell Sci.* Band 111. 1998, S.1963-1971,
- Lamb R.S., Ward R.E., Schweitzer L., Fehon R.G.: *Drosophila* coracle, a member of the protein 4.1 superfamily, has essential structural functions in the septate junctions and developmental functions in embryonic and adult epithelial cells. *Mol. Biol. Cell*. Band 9. 1998, S.3505-3519,
- Lee C., Chen L.B: Dynamics behavior of endoplasmatic reticulum in living cells. *Cell*. Band 54. 1988, S.37-46,
- Leeuwen F.N., Kain H.E., Kammen R.A., Michiels F., Kranenburg O.W., Collard J.G.: The guanine nucleotide exchange factor Tiam I affects neuronal morphology; opposing roles for the small GTPases Rac and Rho. *J. Cell Biol.* Band 139. 1997, S.797-807,
- Li Z., VanAelst L., Cline H.T.: Rho GTPases regulate distinct aspects of dendritic arbor growth in *Xenopus* central neurons in vivo. *Nature Neurosci.* Band 3. 2000, S.217-225,
- Ling E., Danilov Y.N., Cohen C.M.: Modulation of red cell band 4.1 function by cAMP-dependent kinase and protein kinase C phosphorylation. *J. Biol. Chem.* Band 263. 1988, S.244-292,
- Lombardo C.R. and Low P.S.: Calmodulin modulates protein 4.1 binding to human erythrocyte membranes. *Biochim. Biophys. Acta*. Band 1196. 1994, S.394-400,
- Lue R.A., Marfatia S.M., Branton D., Chisthi A.H.: Cloning and characterization of hDlg: the human homologue of the *Drosophila* disc large tumor supressor binds to protein 4.1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Band 91. 1994, S.9818-9822,
- Luque C.M., Correas I.: A constitutive region is responsible for nuclear targeting of protein 4.1R: modulation by alternative sequences results in differential intracellular localization. *J. Cell Sci.* Band 113. 2000, S.2485-2495,
- Luque C.M., Lallena M.-J., Alonso M.A., Correas I.: An alternative domain determines nuclear localization in multifunctional protein 4.1. *J. Biol. Chem.* Band 273. 1998, S.11643-11649,
- Mackay D. and Hall A.: Rho GTPases. *J. Biol. Cell*. Band 273. 1998, S.20685-20686,

- Marchesi S.L., Conboy J., Agre P., Letsinger J.T., Marchesi V.T., Speicher D.W., Mohandas N.: Molecular analysis of insertion/deletion mutations in protein 4.1 in elliptocytosis. I. Biochemical identification of rearrangements in the spectrin/actin binding domain and functional characterizations. *J. Clin. Invest.* Band 86. 1990, S.516-523,
- Marfatia S.M., Lue R., Branton D., Chishti A.H.: Identification of the protein 4.1 binding interface on glycophorin C and p55, a homologue of the *Drosophila* discs-large tumor supressor protein. *J. Biol. Chem.* Band 270. 1995, S.715-719,
- Marfatia S.M., Lue R.A., Branton D., Chishti A.H.: In vitro binding studies suggest a membrane-associated complex between erythroid p55, protein 4.1, and glycophorin C. *J. Biol. Chem.* Band 269. 1994, S.8631-8634,
- Marfatia S.M., Morais-Cabral J.H., Kim A.C., Byron O., Chishti A.H.: The PDZ domain of human erythrocyte p55 mediates its binding to the cytoplasmic carboxyl terminus of glycophorin C. Analysis of the binding interface by in vitro mutagenesis. *J. Biol. Chem.* Band 272. 1997, S.24191-24197,
- Mattagajasingh S.N., Huang S.C., Hartenstein J.S., Hartenstein J.S., Benz E.J. Jr.: Characterization of the interaction between Protein 4.1R and ZO-2: a possible link between the tight junction and the actin cytoskeleton. *J. Biol. Chem.* Band In Press. 2000, S.Manuscript M004578200,
- Mattagajasingh S.N., Huang S.C., Hartenstein J.S., Snyder M., Marchesi V.T., Benz E.J. Jr.: A nonerythroid isoform of protein 4.1R interacts with nuclear mitotic apparatus (NuMA) protein. *J. Cell Biol.* Band 145. 1999, S.29-43,
- McCarthy K.D., Vellis de J.: Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. *J. Cell Biol.* Band 85. 1980, S.890-902,
- Menegoz M., Gaspar P., Le Bert M., Galvez T., Burgaya F., Palfrey C., Ezan P., Arnos F., Girault J.A.: Paranodin, a glycoprotein of neuronal paranodal membranes. *Neuron.* Band 19. 1997, S.319-331,
- Merdes A., Ramyar K., Vechio J.D., Cleveland D.W.: A complex of NuMA and cytoplasmic dynein is essential for mitotic spindle assembly. *Cell.* Band 87. 1996, S.447-458,
- Narumiya S.: The small GTPases Rho: cellular functions and signal transduction. *J. Biochem.* Band 120. 1996, S.215-228,
- Nunomura W., Takakuwa Y., Parra M., Conboy J.G., Mohandas N.: Ca²⁺-dependent and Ca²⁺-independent calmodulin binding sites in erythrocyte protein 4.1. Implications for regulation of protein 4.1 interactions with transmembrane proteins. *J. Biol. Chem.* Band 275. 2000, S.6360-6367,
- Nunomura W., Takakuwa Y., Tokimitsu R., Krauss S.W., Kawashima M., Mohandas N.: Regulation of CD44-protein 4.1 interaction by Ca²⁺ and calmodulin. Implications of modulation of CD44-ankyrin interaction. *J. Biol. Chem.* Band 272. 1997, S.30322-30328,
- Ohara R., Yamakawa H., Nakayama M., Yuasa S., Ohara O.: Cellular and subcellular localization of a newly identified member of the protein 4.1 family, brain 4.1, in the cerebellum of adult and postnatally developing rats. *Dev. Brain Res.* Band 117. 1999, S.127-138,
- Oliff A.: Farnesyltransferase inhibitors: targeting the molecular basis of cancer. *Biochim. Biophys. Acta.* Band 1423. 1999, S.C19-C30,

- Palek J., Lambert S.: Genetics of the red cell membrane skeleton. *Semin. Hematol.* Band 27. 1990, S.290-332,
- Palek J., Sahr K.E.: Mutations of the red blood cell membrane proteins: from clinical evaluation to detection of the underlying genetic defect. *Blood.* Band 80. 1992, S.308-330,
- Parra M., Gascard P., Walensky L.D., Gimm J.A., Blackshaw S., Chan N., Takakuwa Y., Berger T., Lee G., Chasis J.A., Snyder S.H., Mohandas N., Conboy J.G.: Molecular and functional characterization of protein 4.1B, a novel member of the protein 4.1 family with high level, focal expression in brain. *J. Biol. Chem.* Band 275. 2000, S.3247-3255,
- Parra M., Gascard P., Walensky L.D., Snyder S.H., Mohandas N., Conboy J.G.: Cloning and characterization of 4.1G (EPB41L2), a new member of the skeletal protein 4.1 (EPB41) gene family. *Genomics.* Band 49. 1998, S.298-306,
- Pasternack G.R., Racusen R.H.: Erythrocyte protein 4.1 binds and regulates myosin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* Band 86. 1989, S.9712-9716,
- Pearson M.A., Reczak D., Bretscher A., Karpus P.A.: Structure of the ERM protein moesin reveals the FERM domain fold masked by extended actin binding tail domain. *Cell.* Band 101. 2000, S.159-170,
- Peles E., Nativ M., Lustig M., Grumet M., Schilling J., Martinez R., Plowman G.D., Schlessinger J.: Identification of a novel contactin-associated transmembrane receptor with multiple domains implicated in protein-protein interactions. *EMBO J.* Band 16. 1997, S.978-988,
- Peters L.L., Weier H.U., Walensky L.D., Snyder S.H., Parra M., Mohandas N., Conboy J.G.: Four paralogous protein 4.1 genes map to distinct chromosomes in mouse and human. *Genomics.* Band 54. 1998, S.348-350,
- Prendergast G.C.: Farnesyltransferase inhibitors: antineoplastic mechanism and clinical prospects. *Curr. Opin. Cell Biol.* Band 12. 2000, S.166-173,
- Rees D.J., Ades S.E., Singer S.J., Hynes R.O.: Sequence and domain structure of talin. *Nature.* Band 347. 1990, S.685-689,
- Rousseaux-Prévost R., Lesur P., Collier F., Rigot J.M., Venezia N.D., Delaunay J., Gauthier A., Rousseaux J.: Abnormal expression of protein 4.1 in spermatozoa of infertile men with teratospermia. *Lancet.* Band 343. 1994, S.764-765,
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T.: *Molecular cloning: A Laboratory Manual.* Band Band. USA, Cold Spring Harbour, 1989 ,
- Sellers J.R.: Myosins: a diverse superfamily. *Biochim. Biophys. Acta.* Band 1496. 2000, S.3-22,
- Schischmanoff P.O., Yaswen P., Parra M.K., Lee G., Chasis J.A., Mohandas N., Conboy J.G.: Cell shape-dependent regulation of protein 4.1 alternative pre-mRNA splicing in mammary epithelial cells. *J. Biol. Chem.* Band 272. 1997, S.10254-10259,
- Shi Z.-T., Afzal V., Collier B., Patel D., Chasis J.A., Parra M., Lee G., Paszty C., Stevens M., Walensky L., Peters L.L., Mohandas N., Rubin E., Conboy J.G.: Protein 4.1R-deficient mice are viable but have erythroid membrane skeleton abnormalities. *J. Clin. Invest.* Band 103. 1999, S.331-340,
- Shimizu T., Takakuwa Y., Koizumi H., Ishibashi T., Ohkawara A.: Localization of immunological analogues of erythrocyte protein 4.1 and spectrin in epidermis of psoriasis vulgaris. *Histochemistry.* Band 103. 1995, S.363-368,

- Sihag R.K., Wang L.W., Cataldo A.M., Hamlin M., Cohen C.M., Nixon R.A.: Evidence for the association of protein 4.1 immunoreactive forms with neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease brains. *Brain. Res. Band* 656. 1994, S.14-26,
- Steiert P.M., Roop D.R.: Molecular and cellularbiology of intermediate filaments. *Annu. Rev. Biochem. Band* 57. 1988, S.593-626,
- Takakuwa Y. and Mohandas N.: Modulation of erythrocyte membrane material properties Ca²⁺ and calmodulin. Implications for their role in regulation of skeletal interactions. *J. Clin. Invest. Band* 82. 1988, S.394-400,
- Tanaka T., Tatsuno I., Uchida D., Moroo I., Nakamura S., Noguchi Y., Yasuda T., Kitagawa M., Saito Y., Hirai A.: Geranylgeranyl-Pyrophosphate, an isoprenoid of mevalonate cascade, is a critical compound for rat primary culture cortical neurons to protect the cell death induced by 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibition. *J. Neurosci. Band* 20. 2000, S.2852-2859,
- Tang C.-J.C. and Tang T.K.: The 30 kDa domain of protein 4.1 mediates ist binding to the carboxyl terminus of p1Cln, a protein involved in cellular volume regulation. *Blood. Band* 92. 1998, S.1442-1447,
- Tang T.K., Qin Z., Leto T., Marchesi V.T., Benz E.J. Jr.: Heterogeneity of mRNA and protein products arising from the protein 4.1 gene in erythroid and nonerythroid tissues. *J. Cell. Biol. Band* 110. 1990, S.617-624,
- Tchernia G., Mohandas N., Shohet S.B.: Deficiency of skeletal membrane protein 4.1 in homozygous hereditary elliptocytosi. Implications for erythrocyte memmbrane stability. *J. Clin. Invest. Band* 68. 1981, S.454-460,
- Threadgill R., Bobb K., Ghosh A.: Regulation of dendritic growth and remodeling by Rho, Rac, and Cdc42. *Neuron. Band* 19. 1997, S.625-634,
- Traub P.: *Band Band*. New York, Springer , 1985 ,
- Tsukita S., Yonemura S., Tsukita S.: ERM (ezrin/radixin/moesin) family: from cytoskeleton to signal transduction. *Curr. Opin Cell Biol. Band* 9. 1997, S.70-75,
- Tsukita S., Yonemura S., Tsukita S.: ERM proteins: head-to-tail regulation of actin-plasma membrane interaction. *Trends Biochem. Sci. Band* 22. 1997, S.53-58,
- Tsumoto T, Sato H, Sobue K.: Immunohistochemical localization of a membrane-associated, 4.1-like protein in the rat visual cortex during postnatal development. *J. Comp. Neurol. Band* 271. 1988, S.30-43,
- Vaheri A., Carpén O., Heiska L., Helander T.S., Jääskeläinen J., Majander-Nordenswan P., Sainio M., Timonen T., Turunen O.: The ezrin protein family: membrane – cytoskeleton interactions and disease associations. *Curr. Opin. Cell Biol. Band* 9. 1997, S.659-666,
- Vale R.: Intracellular transport using microtubule-based motors. *Annu. Rev. Cell Biol. Band* 2. 1987, S.347-378,
- Vale R.D., Reese T.S., Sheetz M.P.: Identification of a novel force-generating protein, kinesin, involved in microtubule-based motility. *Cell. Band* 42. 1985, S.39-50,
- Vallee R.B., Wall J.S., Paschal B.M., Sheptner H.S.: Microtubule-associated protein 1C from brain is a two-headed cytosolic dynein. *Nature. Band* 332. 1988, S.561-563,
- Van Aelst L., D'Souza-Schorey C.: Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev. Band* 11. 1997, S.2295-2322,

- Wallace R.B., Shaffer J., Murphy R.F., Bonner J., Hirose T. Itarkura K.: Hybridization of synthetic oligodeoxyribonucleotides to phi chi 174 DNA: the effect of single base pair mismatch. *Nucleic Acid. Res. Band 6.* 1972, S.3543-3557,
- Walensky L.D., Blackshaw S., Liao D., Watkins C.C., Weier H.U., Parra M., Haganir R.L., Conboy J.G., Mohandas N., Snyder S.H.: A novel neuron-enriched homolog of the erythrocyte membrane cytoskeletal protein 4.1. *J. Neurosci. Band 19.* 1999, S.6457-6467,
- Walensky L.D., Shi Z.-T., Blackshaw S., DeVries A.C., Demas G.E., Gascard P., Nelson R.J., Conboy J.G., Rubin E.M., Snyder S.H., Mohandas N.: Neurobehavioral deficits in mice lacking the erythrocyte membrane cytoskeletal protein 4.1. *Curr. Biol. Band 8.* 1998, S.1269-1272,
- Ward R.E., Lamb R.S., Fehon R.G.: A conserved functional domain of *Drosophila* coracle is required for localization at the septate junction and has mebrane-organizing activity. *J. Cell Biol. Band 140.* 1998, S.1463-1473,
- Winardi R., Discher D., Kelley C., Zon L., Mays K., Mohandas N., Conboy J.G.: Evolutionarily conserved alternative pre-mRNA splicing regulates structure and function of the spectrin-actin binding domain of erythroid protein 4.1. *Blood. Band 86.* 1995, S.4315-4322,
- Yamakawa H., Ohara O.: Comparsion of mRNA and protein levels of four members of the protein 4.1 family: The type II brain/4.1B/KIAA0987 is the most predominant member of the protein 4.1 family in rat brain. *Gene. Band 248.* 2000, S.137-145,
- Yamakawa H., Ohara R., Nakajima D., Nakayama M., Ohara O.: Molecular characterization of a new member of the protein 4.1 family (brain 4.1) in rat brain. *Mol. Brain Res. Band 70.* 1999, S.197-209,
- Yang Q., Tonks N.K.: Isolation of a cDNA clone encoding a human protein-tyrosine phosphatase with homology to the cytoskeletal-associated proteins band 4.1, ezrin, and talin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Band 88.* 1991, S.5949-5953,
- Yew N.S., Choi H.R., Gallarda J.L., Engel J.D.: Expression of cytoskeletal protein 4.1 during avian erythroid cellular maturation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Band 84.* 1987, S.1035-1039,

Anhang

Protein-Vergleichsanalyse

	1	65
Humemp41	MTTEKSLVTEAENSQHQQKEEGEEA	INSQQEPQQEESCQTAAEGDNWCEQKLKASNGDTPTHED
Humeli	MTTEKSLVTEAENSQHQQKEEGEEA	INSQQEPQQEESCQTAAEGDNWCEHKLKASNGDTPTHED
EPB41	MTTEKSLVTEAENSQHQQKEEGEEA	INSQQEPQQEESCQTAAEGDNWCEHKLKASNGDTPTHED
Klon13	MTTEKSLVTEAENSQHQQKEEGEEA	INSQQEPQQEESCQTAAEGDNWCEHKLKASNGDTPTHED
Klon 9	MTTEKSLVTEAENSQHQQKEEGEEA	INSQQEPQQEESCQTAAEGDNWCEQKLKASNGDTPTHED
Consensus	MTTEKSLVTEAENSQHQQKEEGEEA	INSQQEPQQEESCQTAAEGDNWCE KLKASNGDTPTHED
	66	130
Humemp41	LTKNKERTSESRGLSRLFSSFLKRPKSQVSEEEGKEVESDKEKGEGGQKEIEFGTSLDEEIIILKA	
Humeli	LTKNKERTSENRGLSRLFSSFLKRPKSQVSEEEGKEVESDKEKGEGGQKEIEFGTSLDEEIIILKA	
EPB41	LTKNKERTSENRGLSRLFSSFLKRPKSQVSEEEGKEVESDKEKGEGGQKEIEFGTSLDEEIIILKA	
Klon13	LTKNKERTSENRGLSRLFSSFLKRPKSQVSEEEGKEVESDKEKGEGGQKEIEFGTSLDEEIIILKA	
Klon 9	LTKNKERTSESRGLSRLFSSFLKRPKSQVSEEEGKEVESDKEKGEGGQKEIEFGTSLDEEIIILKA	
Consensus	LTKNKERTSE RGLSRLFSSFLKRPKSQVSEEEGKEVESDKEKGEGGQKEIEFGTSLDEEIIILKA	
	131	195
Humemp41	PIAAPEPELKTDPISDLHSLSSAETQPAQEELREDPDFEIKEGEGGLEECSKIEVKEESPQSKAET	
Humeli	PIAAPEPELKTDPISDLHSLSSAETQPAQEELREDPDFEIKEGEGGLEECSKIEVKEESPQSKAET	
EPB41	PIAAPEPELKTDPISDLHSLSSAETQPAQEELREDPDFEIKEGEGGLEECSKIEVKEESPQSKAET	
Klon13	PIAAPEPELKTDPISDLHSLSSAETQPAQEELREDPDFEIKEGEGGLEECSKIEVKEESPQSKAET	
Klon 9	PIAAPEPELKTDPISDLHSLSSAETQ	
Consensus	PIAAPEPELKTDPISDLHSLSSAETQPAQEELREDPDFEIKEGEGGLEECSKIEVKEESPQSKAET	
	196	260
Humemp41	ELKASQKPIRKHRNMHCKVSLDDTVYECVVEKHAKGQDLLKRVCEHLNLLLEEDYFGLAIWDNAT	
Humeli	ELKASQKPIRKHRNMHCKVSLDDTVYECVVE	
EPB41	ELKASQKPIRKHRNMHCKVSLDDTVYECVVEKHAKGQDLLKRVCEHLNLLLEEDYFGLAIWDNTT	
Klon13	ELKASQKPIRKHRNMHCKVSLDDTVYECVVEKHAKGQDLLKRVCEHLNLLLEEDYFGLAIWDNAT	
Klon 9	ELKASQKPIRKHRNMHCKVSLDDTVYECVVEKHAKGQDLLKRVCEHLNLLLEEDYFGLAIWDNAT	
Consensus	ELKASQKPIRKHRNMHCKVSLDDTVYECVVEKHAKGQDLLKRVCEHLNLLLEEDYFGLAIWDN T	
	261	325
Humemp41	SKTWLDSAKEIKKQVRGVPWNFTFNVKFYPPDPAQLTEDITRYYLCLQLRQDIVAGRLPCSFTATL	
Humeli	SKTWLDSAKEIKKQVRGVPWNFTFNVKFYPPDPAQLTEDITRYYLCLQLRQDIVAGRLPCSFTATL	
EPB41	SKTWLDSAKEIKKQVRGVPWNFTFNVKFYPPDPAQLTEDITRYYLCLQLRQDIVAGRLPCSFTATL	
Klon13	SKTWLDSAKEIKKQVRGVPWNFTFNVKFYPPDPAQLTEDITRYYLCLQLRQDIVAGRLPCSFTATL	
Klon 9	SKTWLDSAKEIKKQVRGVPWNFTFNVKFYPPDPAQLTEDITRYYLCLQLRQDIVAGRLPCSFTATL	
Consensus	SKTWLDSAKEIKKQVRGVPWNFTFNVKFYPPDPAQLTEDITRYYLCLQLRQDIVAGRLPCSFTATL	
	326	390
Humemp41	ALLGSYTIQSELGDYDPELHGVDYVSDFKLAPNQTKLEEKVMELHKSYSRSMTPAQADLEFLENA	
Humeli	ALLGSYTIQSELGDYDPELHGVDYVSDFKLAPNQTKLEEKVMELHKSYSRSMTPAQADLEFLENA	
EPB41	ALLGSYTIQSELGDYDPELHGVDYVSDFKLAPNQTKLEEKVMELHKSYSRSMTPAQADLEFLENA	
Klon13	ALLGSYTIQSELGDYDPELHGVDYVSDFKLAPNQTKLEEKVMELHKSYSRSMTPAQADLEFLENA	
Klon 9	ALLGSYTIQSELGDYDPELHGVDYVSDFKLAPNQTKLEEKVMELHKSYSRSMTPAQADLEFLENA	
Consensus	ALLGSYTIQSELGDYDPELHGVDYVSDFKLAPNQTKLEEKVMELHKSYSRSMTPAQADLEFLENA	

Humemp41	391	KKLSMYGVDLHKAKDLEGVDIILGVCSSGLLVYKDKLRINRFPWPVKVKISYKRSSFFIKIRPGE	455
Humeli		KKLSMYGVDLHKAKDLEGVDIILGVCSSGLLVYKDKLRINRFPWPVKVKISYKRSSFFIKIRPGE	
EPB41		KKLSMYGVDLHKAKDLEGVDIILGVCSSGLLVYKDKLRINRFPWPVKVKISYKRSSFFIKIRPGE	
Klon13		KKLSMYGVDLHKAKDLEGVDIILGVCSSGLLVYKDKLRINRFPWPVKVKISYKRSSFFIKIRPGE	
Klon 9		KKLSMYGVDLHKAKDLEGVDIILGVCSSGLLVYKDKLRINRFPWPVKVKISYKRSSFFIKIRPGE	
Consensus		KKLSMYGVDLHKAKDLEGVDIILGVCSSGLLVYKDKLRINRFPWPVKVKISYKRSSFFIKIRPGE	
Humemp41	456	QEYESTIGFKLPSYRAAKKLWKVCVEHHTFFRLTSTDITPKSKFLALGSKFRYSGRGTAQTRQA	520
Humeli		QEYESTIGFKLPSYRAAKKLWKVCVEHHTFFRLTSTDITPKSKFLALGSKFRYSGRGTAQTRQA	
EPB41		QEYESTIGFKLPSYRAAKKLWKVCVEHHTFFRLTSTDITPKSKFLALGSKFRYSGRGTAQTRQA	
Klon13		QEYESTIGFKLPSYRAAKKLWKVCVEHHTFFRLTSTDITPKSKFLALGSKFRYSGRGTAQTRQA	
Klon 9		QEYESTIGFKLPSYRAAKKLWKVCVEHHTFFRLTSTDITPKSKFLALGSKFRYSGRGTAQTRQA	
Consensus		QEYESTIGFKLPSYRAAKKLWKVCVEHHTFFRLTSTDITPKSKFLALGSKFRYSGRGTAQTRQA	
Humemp41	521	SALIDRPAPHFERTASKRASRSLDGAAVDSADRSPRPTSAPAITQGQVAEGGVLDASAKKTVVP	585
Humeli		SALIDRPAPHFERTASKRASRSLDGAAVDSADRSPRPTSAPAITQGQVAEGGVLDASAKKTVVP	
EPB41		SALIDRPAPHFERTASKRASRSLDGAAVDSADRSPRPTSAPAITQGQVAEGGVLDASAKKTVVP	
Klon13		SALIDRPAPHFERTASKRASRSLDGAAVDSADRSPRPTSAPAITQGQVAEGGVLDASAKKTVVP	
Klon 9		SALIDRPAPHFERTASKRASRSLDGAAVDSADRSPRPTSAPAITQGQVAEGGVLDASAKKTVVP	
Consensus		SALIDRPAPHFERTASKRASRSLDGAAVDSADRSPRPTSAPAITQGQVAEGGVLDASAKKTVVP	
Humemp41	586	KAQKETVKAQEVKKEDPEPQAEPEPTEAWKVEKTHIEVTVPSTNGDQTQ-----KK	650
Humeli		KAQKETVKAQEVKKEDPEPQAEPEPTEAWK-----	
EPB41		KAQKETVKAQEVKKEDPEPQAEPEPTEAWKVEKTHIEVTVPSTNGDQTQKLAEKTEDLIRMRRKK	
Klon13		KAQKETVKAQEVKKEDPEPQAEPEPTEAWKVEKTHIEVTVPSTNGDQTQKLAEKTEDLIRMRRKK	
Klon 9		KAQKETVKAQEVKKEDPEPQAEPEPTEAWKVEKTHIEVTVPSTNGDQTQKLAEKTEDLIRMRRK--	
Consensus		KAQKETVKAQEVKKEDPEPQAEPEPTEAWKVEKTHIEVTVPSTNGDQTQKLAEKTEDLIRMRRKK	
Humemp41	651	RERLDGENIYIRHSLMLEDLDKSQEEIKKHASISELKKNFMESVPEPRPSEWDKRLSTHSPFR	715
Humeli		-----DLDKSQEEIKKHASISELKKNFMESVPEPRPSEWDKRLSTHSPFR	
EPB41		RERLDGENIYIRHSLMLEDLDKSQEEIEKHASISELKKNFMESVPEPRPSEWDKRLSTHSPFR	
Klon13		RERLDGENIYIRHSLMLEDLDKSQEEIKKHASISELKKNFMESVPEPRPSEWDKRLSTHSPFR	
Klon 9		-----DLDKSQEEIKKHASISELKKNFMESVPEPRPSEWDKRLSTHSPFR	
Consensus		RERLDGENIYIRHSLMLEDLDKSQEEIKKHASISELKKNFMESVPEPRPSEWDKRLSTHSPFR	
Humemp41	716	TLNINGQIPTGEGPPLVKTQTVTISDNANAVKSEIPTKDVPIVHTETKTIITYEAAQTDDNSGDLD	780
Humeli		TLNINGQIPTGEGPPLVKTQTVTISDNANAVKSEIPTKDVPIVHTETKTIITYEAAQTDDNSGDLD	
EPB41		TLNINGQIPTGEGPPLVKTQTVTISDNANAVKSEIPTKDVPIVHTETKTIITYEAAQTDDNSGDLD	
Klon13		TLNINGQIPTGEGPPLVKTQTVTISDNANAVKSEIPTKDVPIVHTETKTIITYEAAQTDDNSGDLD	
Klon 9		TLNINGQIPTGEGPPLVKTQTVTISDNANAVKSEIPTKDVPIVHTETKTIITYEAAQTDDNSGDLD	
Consensus		TLNINGQIPTGEGPPLVKTQTVTISDNANAVKSEIPTKDVPIVHTETKTIITYEAAQTDDNSGDLD	
Humemp41	781	PGVLLTAQTITSETPSSTTTTQITKTVKGGISETRIEKRIVITGDADIDHDQVLVQAIKEAKEQH	845
Humeli		PGVLLTAQTITSETPSSTTTTQITKTVKGGISETRIEKRIVITGDADIDHDQVLVQAIKEAKEQH	
EPB41		PGVLLTAQTITSETPSSTTTTQITKTVKGGISETRIEKRIVITGDADIDHDQVLVQAIKEAKEQH	
Klon13		PGVLLTAQTITSETPSSTTTTQITKTVKGGISETRIEKRIVITGDADIDHDQVLVQAIKEAKEQH	
Klon 9		PGVLLTAQTITSETPSSTTTTQITKTVKGGISETRIEKRIVITGDADIDHDQVLVQAIKEAKEQH	
Consensus		PGVLLTAQTITSETPSSTTTTQITKTVKGGISETRIEKRIVITGDADIDHDQVLVQAIKEAKEQH	
Humemp41	846	PDMSVTKVVVHQETEIADE	864
Humeli		PDMSVTKVVVHQETEIADE	
EPB41		PDMSVTKVVVHQETEIADE	
Klon13		PDMSVTKVVVHQETEIADE	
Klon 9		PDMSVTKVVVHQETEIADE	
Consensus		PDMSVTKVVVHQETEIADE	

DNA-Vergleichsanalyse

	1	65
Humemp41	TCCCGTGGAGCAGAGGGGCAAAGTGGCAGGAACCTCTTAAAGGGCGAGACGGGCGGCGACCGGAGA	
Humeli	-----	AGA
EPB41	-----	
Klon13	-----	
Klon 9	-----	
Consensus		
	66	130
Humemp41	ACGCGGTTCGGCCCCGGTCCCCGCCGCACCCAGCCCAGCAACATCATGACAACAGAGAAGAGTTTAG	
Humeli	ACGCGGTTCGGCCCCGGTCCCCGCCGCACCCAGCCCAGCAACATCATGACAACAGAGAAGAGTTTAG	
EPB41	-----	ATGACAACAGAGAAGAGTTTAG
Klon13	-----	CCAGCCCAGCAACATCATGACAACAGAGAAGAGTTTAG
Klon 9	-----	CCAGCCCAGCAACATCATGACAACAGAGAAGAGTTTAG
Consensus		CCAGCCCAGCAACATCATGACAACAGAGAAGAGTTTAG
	131	195
Humemp41	TGACTGAGGCCGAAAATTTCACAGCACCAACAGAAGGAAGAGGGTGAGGAAGCCATAAACTCAGGC	
Humeli	TGACTGAGGCCGAAAATTTCACAGCACCAACAGAAGGAAGAGGGTGAGGAAGCCATAAACTCAGGC	
EPB41	TGACTGAGGCCGAAAATTTCACAGCACCAACAGAAGGAAGAGGGTGAGGAAGCCATAAACTCAGGC	
Klon13	TGACTGAGGCCGAAAATTTCACAGCACCAACAGAAGGAAGAGGGTGAGGAAGCCATAAACTCAGGC	
Klon 9	TGACTGAGGCCGAAAATTTCACAGCACCAACAGAAGGAAGAGGGTGAGGAAGCCATAAACTCAGGC	
Consensus	TGACTGAGGCCGAAAATTTCACAGCACCAACAGAAGGAAGAGGGTGAGGAAGCCATAAACTCAGGC	
	196	260
Humemp41	CAACAAGAACCTCAGCAGGAGGAATCTTGTCAAACAGCAGCTGAAGGAGATAATTGGTGTGAACA	
Humeli	CAACAAGAACCTCAGCAGGAGGAATCTTGTCAAACAGCAGCTGAAGGAGATAATTGGTGTGAACA	
EPB41	CAACAAGAACCTCAGCAGGAGGAATCTTGTCAAACAGCAGCTGAAGGAGATAATTGGTGTGAACA	
Klon13	CAACAAGAACCTCAGCAGGAGGAATCTTGTCAAACAGCAGCTGAAGGAGATAATTGGTGTGAACA	
Klon 9	CAACAAGAACCTCAGCAGGAGGAATCTTGTCAAACAGCAGCTGAAGGAGATAATTGGTGTGAACA	
Consensus	CAACAAGAACCTCAGCAGGAGGAATCTTGTCAAACAGCAGCTGAAGGAGATAATTGGTGTGAACA	
	261	325
Humemp41	CAAGGTGAAAGCTTCTAATGGAGACACTCCTACACATGAAGACTTGACCAAGAACAAGGAGCGGA	
Humeli	GAAGCTGAAAGCTTCTAATGGAGACACTCCTACACATGAAGACTTGACCAAGAACAAGGAGCGGA	
EPB41	TAAGCTGAAAGCTTCTAATGGAGACACTCCTACACATGAAGACTTGACCAAGAACAAGGAGCGGA	
Klon13	TAAGCTGAAAGCTTCTAATGGAGACACTCCTACACATGAAGACTTGACCAAGAACAAGGAGCGGA	
Klon 9	GAAGCTGAAAGCTTCTAATGGAGACACTCCTACACATGAAGACTTGACCAAGAACAAGGAGCGGA	
Consensus	AAGCTGAAAGCTTCTAATGGAGACACTCCTACACATGAAGACTTGACCAAGAACAAGGAGCGGA	
	326	390
Humemp41	CATCAGAAAACAGAGGACTTTACGACTATTCTCCTCGTTTCTCAAAGGCCCAAATCTCAGGTG	
Humeli	CATCAGAAAACAGAGGACTTTACGACTATTCTCCTCGTTTCTCAAAGGCCCAAATCTCAGGTG	
EPB41	CATCAGAAAACAGAGGACTTTACGACTATTCTCCTCGTTTCTCAAAGGCCCAAATCTCAGGTG	
Klon13	CATCAGAAAACAGAGGACTTTACGACTATTCTCCTCGTTTCTCAAAGGCCCAAATCTCAGGTG	
Klon 9	CATCAGAAAACAGAGGACTTTACGACTATTCTCCTCGTTTCTCAAAGGCCCAAATCTCAGGTG	
Consensus	CATCAGAAAACAGAGGACTTTACGACTATTCTCCTCGTTTCTCAAAGGCCCAAATCTCAGGTG	

	391	455
Humemp41	TCCGAGGAAGAAGGCAAAGAAGTAGAGTCAGATAAAGAAAAAGGTGAAGGAGGT	CAGAAAGAGAT
Humeli	TCCGAGGAAGAAGGCAAAGAAGTAGAGTCAGATAAAGAAAAAGGTGAAGGAGGT	CAGAAAGAGAT
EPB41	TCCGAGGAAGAAGGCAAAGAAGTAGAGTCAGATAAAGAAAAAGGTGAAGGAGGT	CAGAAAGAGAT
Klon13	TCCGAGGAAGAAGGCAAAGAAGTAGAGTCAGATAAAGAAAAAGGTGAAGGAGGT	CAGAAAGAGAT
Klon 9	TCCGAGGAAGAAGGCAAAGAAGTAGAGTCAGATAAAGAAAAAGGTGAAGGAGGT	CAGAAAGAGAT
Consensus	TCCGAGGAAGAAGGCAAAGAAGTAGAGTCAGATAAAGAAAAAGGTGAAGGAGGT	CAGAAAGAGAT
	456	520
Humemp41	AGAATTTGGAACCAAGTCTTGATGAAGAGATCATTTTAAAGGCCCAATTGCAGCTCCTGAACCGG	
Humeli	AGAATTTGGAACCAAGTCTTGATGAAGAGATCATTTTAAAGGCCCAATTGCAGCTCCTGAACCGG	
EPB41	AGAATTTGGAACCAAGTCTTGATGAAGAGATCATTTTAAAGGCCCAATTGCAGCTCCTGAACCGG	
Klon13	AGAATTTGGAACCAAGTCTTGATGAAGAGATCATTTTAAAGGCCCAATTGCAGCTCCTGAACCGG	
Klon 9	AGAATTTGGAACCAAGTCTTGATGAAGAGATCATTTTAAAGGCCCAATTGCAGCTCCTGAACCGG	
Consensus	AGAATTTGGAACCAAGTCTTGATGAAGAGATCATTTTAAAGGCCCAATTGCAGCTCCTGAACCGG	
	521	585
Humemp41	AACTCAAAACAGACCCATCTTTGGATCTTCATTCATTAAGCAGTGCAGAAACACAGCCT	CACCAT
Humeli	AACTCAAAACAGACCCATCTTTGGATCTTCATTCATTAAGCAGTGCAGAAACACAGCCT	-----
EPB41	AACTCAAAACAGACCCATCTTTGGATCTTCATTCATTAAGCAGTGCAGAAACACAGCCT	-----
Klon13	AACTCAAAACAGACCCATCTTTGGATCTTCATTCATTAAGCAGTGCAGAAACACAGCCT	-----
Klon 9	AACTCAAAACAGACCCATCTTTGGATCTTCATTCATTAAGCAGTGCAGAAACACAGCCT	-----
Consensus	AACTCAAAACAGACCCATCTTTGGATCTTCATTCATTAAGCAGTGCAGAAACACAGCCT	
	586	650
Humemp41	TACAATTAAGAATTATTTTAGAGTCTTCTTATTTCTGAAGCATGTGAATATTATCTCGATCGTT	
Humeli	-----	
EPB41	-----	
Klon13	-----	
Klon 9	-----	
Consensus	-----	
	651	715
Humemp41	AAAAGTCCTGCTCAGGAAGAACTCAGAGAAGATCCAGATTTCTGAAATTAAGGAAGGAGAAGGACT	
Humeli	-----GCTCAGGAAGAACTCAGAGAAGATCCAGATTTTGAATTAAGGAAGGAGAAGGACT	
EPB41	-----GCTCAGGAAGAACTCAGAGAAGATCCAGATTTTGAATTAAGGAAGGAGAAGGACT	
Klon13	-----GCTCAGGAAGAACTCAGAGAAGATCCAGATTTTGAATTAAGGAAGGAGAAGGACT	
Klon 9	-----GCTCAGGAAGAACTCAGAGAAGATCCAGATTTTGAATTAAGGAAGGAGAAGGACT	
Consensus	GCTCAGGAAGAACTCAGAGAAGATCCAGATTTTGAATTAAGGAAGGAGAAGGACT	
	716	780
Humemp41	TGAAGAGTGCTCCAAAATAGAAGTAAAAGAAGAAAGCCCTCAATCAAAGCAGAAACAGAATTAA	
Humeli	TGAAGAGTGCTCCAAAATAGAAGTAAAAGAAGAAAGCCCTCAATCAAAGCAGAAACAGAATTAA	
EPB41	TGAAGAGTGCTCCAAAATAGAAGTAAAAGAAGAAAGCCCTCAATCAAAGCAGAAACAGAATTAA	
Klon13	TGAAGAGTGCTCCAAAATAGAAGTAAAAGAAGAAAGCCCTCAATCAAAGCAGAAACAGAATTAA	
Klon 9	-----	
Consensus	TGAAGAGTGCTCCAAAATAGAAGTAAAAGAAGAAAGCCCTCAATCAAAGCAGAAACAGAATTAA	

	781	845
Humemp41	AAGCTTCCCAAAAACCAATCAGAAAAACACAGGAACATGCACTGCAAGGTTTCTTTGTTGGATGAC	
Humeli	AAGCTTCCCAAAAACCAATCAGAAAAACACAGGAACATGCACTGCAAGGTTTCTTTGTTGGATGAC	
EPB41	AAGCTTCCCAAAAACCAATCAGAAAAACACAGGAACATGCACTGCAAGGTTTCTTTGTTGGATGAC	
Klon13	AAGCTTCCCAAAAACCAATCAGAAAAACACAGGAACATGCACTGCAAGGTTTCTTTGTTGGATGAC	
Klon 9	-----	
Consensus	AAGCTTCCCAAAAACCAATCAGAAAAACACAGGAACATGCACTGCAAGGTTTCTTTGTTGGATGAC	
	846	910
Humemp41	ACAGTTTATGAATGTGTTGTGGAGAAACATGCTAAGGGACAAGATTGCTTAAACGAGTATGTGA	
Humeli	ACAGTTTATGAATGTGTTGTGGAGAAACATGCTAAGGGACAAGATTGCTTAAACGAGTATGTGA	
EPB41	ACAGTTTATGAATGTGTTGTGGAGAAACATGCTAAGGGACAAGATTGCTTAAACGAGTATGTGA	
Klon13	ACAGTTTATGAATGTGTTGTGGAGAAACATGCTAAGGGACAAGATTGCTTAAACGAGTATGTGA	
Klon 9	-----	
Consensus	ACAGTTTATGAATGTGTTGTGGAGAAACATGCTAAGGGACAAGATTGCTTAAACGAGTATGTGA	
	911	975
Humemp41	GCATCTCAATCTTTTGGGAAGAAGACTATTTTGGTCTAGCCATTGTTGGGATAACGCAACCTCTAAGA	
Humeli	-----	
EPB41	GCATCTCAATCTTTTGGGAAGAAGACTATTTTGGTCTAGCCATTGTTGGGATAACGCAACCTCTAAGA	
Klon13	GCATCTCAATCTTTTGGGAAGAAGACTATTTTGGTCTAGCCATTGTTGGGATAACGCAACCTCTAAGA	
Klon 9	-----	
Consensus	GCATCTCAATCTTTTGGGAAGAAGACTATTTTGGTCTAGCCATTGTTGGGATAAC CAACCTCTAAGA	
	976	1040
Humemp41	CATGGCTGGATTCCGCCAAAAGAAATAAAAAAGCAGGTTTCGTGGTGTCCCTTGGAATTTTACATTT	
Humeli	CATGGCTGGATTCCGCCAAAAGAAATAAAAAAGCAGGTTTCGTGGTGTCCCTTGGAATTTTACATTT	
EPB41	CATGGCTGGATTCCGCCAAAAGAAATAAAAAAGCAGGTTTCGTGGTGTCCCTTGGAATTTTACATTT	
Klon13	CATGGCTGGATTCCGCCAAAAGAAATAAAAAAGCAGGTTTCGTGGTGTCCCTTGGAATTTTACATTT	
Klon 9	CATGGCTGGATTCCGCCAAAAGAAATAAAAAAGCAGGTTTCGTGGTGTCCCTTGGAATTTTACATTT	
Consensus	CATGGCTGGATTCCGCCAAAAGAAATAAAAAAGCAGGTTTCGTGGTGTCCCTTGGAATTTTACATTT	
	1041	1105
Humemp41	AATGTAAAGTTTTATCCACCTGACCCAGCACAGTTAACAGAAGACATAACAAGATATTATTTATG	
Humeli	AATGTAAAGTTTTATCCACCTGACCCAGCACAGTTAACAGAAGACATAACAAGATATTATTTATG	
EPB41	AATGTAAAGTTTTATCCACCTGACCCAGCACAGTTAACAGAAGACATAACAAGATATTATTTATG	
Klon13	AATGTAAAGTTTTATCCACCTGACCCAGCACAGTTAACAGAAGACATAACAAGATATTATTTATG	
Klon 9	AATGTAAAGTTTTATCCACCTGACCCAGCACAGTTAACAGAAGACATAACAAGATATTATTTATG	
Consensus	AATGTAAAGTTTTATCCACCTGACCCAGCACAGTTAACAGAAGACATAACAAGATATTATTTATG	
	1106	1170
Humemp41	TCTTCAGCTTCGGCAGGACATAGTTGCAGGACGTCTGCCCTGTTTCCTTTGCAACCTTAGCATTAT	
Humeli	TCTTCAGCTTCGGCAGGACATAGTTGCAGGACGTCTGCCCTGTTTCCTTTGCAACCTTAGCATTAT	
EPB41	TCTTCAGCTTCGGCAGGACATAGTTGCAGGACGTCTGCCCTGTTTCCTTTGCAACCTTAGCATTAT	
Klon13	TCTTCAGCTTCGGCAGGACATAGTTGCAGGACGTCTGCCCTGTTTCCTTTGCAACCTTAGCATTAT	
Klon 9	TCTTCAGCTTCGGCAGGACATAGTTGCAGGACGTCTGCCCTGTTTCCTTTGCAACCTTAGCATTAT	
Consensus	TCTTCAGCTTCGGCAGGACATAGTTGCAGGACGTCTGCCCTGTTTCCTTTGCAACCTTAGCATTAT	

79

	1951		2015
Humemp41	AGAAGGAAACAGTGAAGGCTGAAGTGAAAAAGGAAGACGAGCCACCTGAGCAAGCTGAGCCAGAG		
Humeli	AGAAGGAAACAGTGAAGGCTGAAGTGAAAAAGGAAGACGAGCCACCTGAGCAAGCTGAGCCAGAG		
EPB41	AGAAGGAAACAGTGAAGGCTGAAGTGAAAAAGGAAGACGAGCCACCTGAGCAAGCTGAGCCAGAG		
Klon13	AGAAGGAAACAGTGAAGGCTGAAGTGAAAAAGGAAGACGAGCCACCTGAGCAAGCTGAGCCAGAG		
Klon 9	AGAAGGAAACAGTGAAGGCTGAAGTGAAAAAGGAAGACGAGCCACCTGAGCAAGCTGAGCCAGAG		
Consensus	AGAAGGAAACAGTGAAGGCTGAAGTGAAAAAGGAAGACGAGCCACCTGAGCAAGCTGAGCCAGAG		
	2016		2080
Humemp41	CCCACAGAAGCATGGAAGGTGGAAAAAACCACATCGAGGTGACAGTACCCACCTCAAATGGTGA		
Humeli	CCCACAGAAGCATGGAAGGTGGAAAAAACCACATCGAGGTGACAGTACCCACCTCAAATGGTGA		
EPB41	CCCACAGAAGCATGGAAGGTGGAAAAAACCACATCGAGGTGACAGTACCCACCTCAAATGGTGA		
Klon13	CCCACAGAAGCATGGAAGGTGGAAAAAACCACATCGAGGTGACAGTACCCACCTCAAATGGTGA		
Klon 9	CCCACAGAAGCATGGAAGGTGGAAAAAACCACATCGAGGTGACAGTACCCACCTCAAATGGTGA		
Consensus	CCCACAGAAGCATGGAAGGTGGAAAAAACCACATCGAGGTGACAGTACCCACCTCAAATGGTGA		
	2081		2145
Humemp41	CCAAACACAG-----AAAAAGAGAGAAA		
Humeli	CCAAACACAGAGCTTGCAGAAAAAACTGAAGATCTGATAAGAATGAGGAAGAAAAAGAGAGAAA		
EPB41	CCAAACACAGAGCTTGCAGAAAAAACTGAAGATCTGATAAGAATGAGGAAGAAAAAGAGAGAAA		
Klon13	CCAAACACAGAGCTTGCAGAAAAAACTGAAGATCTGATAAGAATGAGGAAGAAAAAGAGAGAAA		
Klon 9	CCAAACACAGAGCTTGCAGAAAAAACTGAAGATCTGATAAGAATGAGGAAG-----		
Consensus	CCAAACACAGAGCTTGCAGAAAAAACTGAAGATCTGATAAGAATGAGGAAGAAAAAGAGAGAAA		
	2146		2210
Humemp41	GACTAGATGGTGAAAACATTTATATCAGACATAGCAATTTAATGTTGGAGGATTTAGACAAGAGT		
Humeli	GACTAGATGGTGAAAACATTTATATCAGACATAGCAATTTAATGTTGGAGGATTTAGACAAGAGT		
EPB41	GACTAGATGGTGAAAACATTTATATCAGACATAGCAATTTAATGTTGGAGGATTTAGACAAGAGT		
Klon13	GACTAGATGGTGAAAACATTTATATCAGACATAGCAATTTAATGTTGGAGGATTTAGACAAGAGT		
Klon 9	GACTAGATGGTGAAAACATTTATATCAGACATAGCAATTTAATGTTGGAGGATTTAGACAAGAGT		
Consensus	GACTAGATGGTGAAAACATTTATATCAGACATAGCAATTTAATGTTGGAGGATTTAGACAAGAGT		
	2211		2275
Humemp41	CAAGAGGAGATCAAAAAACATCATGCCAGCATCAGTGAGCTGAAAAAGAACTTCATGGAGTCTGT		
Humeli	CAAGAGGAGATCAAAAAACATCATGCCAGCATCAGTGAGCTGAAAAAGAACTTCATGGAGTCTGT		
EPB41	CAAGAGGAGATCAAAAAACATCATGCCAGCATCAGTGAGCTGAAAAAGAACTTCATGGAGTCTGT		
Klon13	CAAGAGGAGATCAAAAAACATCATGCCAGCATCAGTGAGCTGAAAAAGAACTTCATGGAGTCTGT		
Klon 9	CAAGAGGAGATCAAAAAACATCATGCCAGCATCAGTGAGCTGAAAAAGAACTTCATGGAGTCTGT		
Consensus	CAAGAGGAGATCAAAAAACATCATGCCAGCATCAGTGAGCTGAAAAAGAACTTCATGGAGTCTGT		
	2276		2340
Humemp41	ACCAGAACCACGGCCTAGTGAATGGGATAAACGCTTATCCACTCACTCACCCTTCCGAACTCTTA		
Humeli	ACCAGAACCACGGCCTAGTGAATGGGATAAACGCTTATCCACTCACTCACCCTTCCGAACTCTTA		
EPB41	ACCAGAACCACGGCCTAGTGAATGGGATAAACGCTTATCCACTCACTCACCCTTCCGAACTCTTA		
Klon13	ACCAGAACCACGGCCTAGTGAATGGGATAAACGCTTATCCACTCACTCACCCTTCCGAACTCTTA		
Klon 9	ACCAGAACCACGGCCTAGTGAATGGGATAAACGCTTATCCACTCACTCACCCTTCCGAACTCTTA		
Consensus	ACCAGAACCACGGCCTAGTGAATGGGATAAACGCTTATCCACTCACTCACCCTTCCGAACTCTTA		

	2341		2405
Humemp41	ACATCAATGGGCAAATCCCCACAGGAGAAGGACCTCCCCTGGTGAAGACACAACTGTCACCATC		
Humeli	ACATCAATGGGCAAATCCCCACAGGAGAAGGACCTCCCCTGGTGAAGACACAACTGTCACCATC		
EPB41	ACATCAATGGGCAAATCCCCACAGGAGAAGGACCTCCCCTGGTGAAGACACAACTGTCACCATC		
Klon13	ACATCAATGGGCAAATCCCCACAGGAGAAGGACCTCCCCTGGTGAAGACACAACTGTCACCATC		
Klon 9	ACATCAATGGGCAAATCCCCACAGGAGAAGGACCTCCCCTGGTGAAGACACAACTGTCACCATC		
Consensus	ACATCAATGGGCAAATCCCCACAGGAGAAGGACCTCCCCTGGTGAAGACACAACTGTCACCATC		
	2406		2470
Humemp41	TCAGATAATGCCAATGCTGTGAAAAGTGAAATCCCAACCAAAGACGTCCCTATTGTCCACACTGA		
Humeli	TCAGATAATGCCAATGCTGTGAAAAGTGAAATCCCAACCAAAGACGTCCCTATTGTCCACACTGA		
EPB41	TCAGATAATGCCAATGCTGTGAAAAGTGAAATCCCAACCAAAGACGTCCCTATTGTCCACACTGA		
Klon13	TCAGATAATGCCAATGCTGTGAAAAGTGAAATCCCAACCAAAGACGTCCCTATTGTCCACACTGA		
Klon 9	TCAGATAATGCCAATGCTGTGAAAAGTGAAATCCCAACCAAAGACGTCCCTATTGTCCACACTGA		
Consensus	TCAGATAATGCCAATGCTGTGAAAAGTGAAATCCCAACCAAAGACGTCCCTATTGTCCACACTGA		
	2471		2535
Humemp41	GACCAAGACCATCACTTATGAGGCTGCCCAGACTGACGACAACAGTGGAGACTTGGACCCAGGAG		
Humeli	GACCAAGACCATCACTTATGAGGCTGCCCAGACTGACGACAACAGTGGAGACTTGGACCCAGGAG		
EPB41	GACCAAGACCATCACTTATGAGGCTGCCCAGACTGACGACAACAGTGGAGACTTGGACCCAGGAG		
Klon13	GACCAAGACCATCACTTATGAGGCTGCCCAGACTGACGACAACAGTGGAGACTTGGACCCAGGAG		
Klon 9	GACCAAGACCATCACTTATGAGGCTGCCCAGACTGACGACAACAGTGGAGACTTGGACCCAGGAG		
Consensus	GACCAAGACCATCACTTATGAGGCTGCCCAGACTGACGACAACAGTGGAGACTTGGACCCAGGAG		
	2536		2600
Humemp41	TCTTGCTGACAGCTCAAACATATCACATCTGAGACCCCAAGCAGCACCACCACAACCTCAAATTACC		
Humeli	TCTTGCTGACAGCTCAAACATATCACATCTGAGACCCCAAGCAGCACCACCACAACCTAAAATTACC		
EPB41	TCTTGCTGACAGCTCAAACATATCACATCTGAGACCCCAAGCAGCACCACCACAACCTCAAATTACC		
Klon13	TCTTGCTGACAGCTCAAACATATCACATCTGAGACCCCAAGCAGCACCACCACAACCTCAAATTACC		
Klon 9	TCTTGCTGACAGCTCAAACATATCACATCTGAGACCCCAAGCAGCACCACCACAACCTCAAATTACC		
Consensus	TCTTGCTGACAGCTCAAACATATCACATCTGAGACCCCAAGCAGCACCACCACAACCTCAAATTACC		
	2601		2665
Humemp41	AAGACTGTAAAAGGTGGGATTTTCAGAGACACGTATTGAAAAGAGAATTGTGATCACAGGAGATGC		
Humeli	AAGACTGTAAAAGGTGGGATTTTCAGAGACACGTATTGAAAAGAGAATTGTGATCACAGGAGATGC		
EPB41	AAGACTGTAAAAGGTGGGATTTTCAGAGACACGTATTGAAAAGAGAATTGTGATCACAGGAGATGC		
Klon13	AAGACTGTAAAAGGTGGGATTTTCAGAGACACGTATTGAAAAGAGAATTGTGATCACAGGAGATGC		
Klon 9	AAGACTGTAAAAGGTGGGATTTTCAGAGACACGTATTGAAAAGAGAATTGTGATCACAGGAGATGC		
Consensus	AAGACTGTAAAAGGTGGGATTTTCAGAGACACGTATTGAAAAGAGAATTGTGATCACAGGAGATGC		
	2666		2730
Humemp41	TGATATTGACCATGATCAGGTCCTTGTACAAGCCATCAAGGAGGCCAAGGAGCAGCACCAGACA		
Humeli	TGATATTGACCATGATCAGGTCCTTGTACAAGCCATCAAGGAGGCCAAGGAGCAGCACCAGACA		
EPB41	TGATATTGACCATGATCAGGTCCTTGTACAAGCCATCAAGGAGGCCAAGGAGCAGCACCAGACA		
Klon13	TGATATTGACCATGATCAGGTCCTTGTACAAGCCATCAAGGAGGCCAAGGAGCAGCACCAGACA		
Klon 9	TGATATTGACCATGATCAGGTCCTTGTACAAGCCATCAAGGAGGCCAAGGAGCAGCACCAGACA		
Consensus	TGATATTGACCATGATCAGGTCCTTGTACAAGCCATCAAGGAGGCCAAGGAGCAGCACCAGACA		

	2731	2795
Humemp41	TGTCAGTGACCAAGGTGGTCGTCCACCAGGAGACCGAGATTGCTGATGAGTGA	GCTCAGGAACCTA
Humeli	TGTCAGTGACCAAGGTGGTCGTCCACCAGGAGACCGAGATTGCTGATGAGTGA	GCTCAGGAACCTA
EPB41	TGTCAGTGACCAAGGTGGTCGTCCACCAGGAGACCGAGATTGCTGATGAGTGA	-----
Klon13	TGTCAGTGACCAAGGTGGTCGTCCACCAGGAGACCGAGATTGCTGATGAGTGA	-----
Klon 9	TGTCAGTGACCAAGGTGGTCGTCCACCAGGAGACCGAGATTGCTGATGAGTGA	-----
Consensus	TGTCAGTGACCAAGGTGGTCGTCCACCAGGAGACCGAGATTGCTGATGAGTGA	
	2796	2860
Humemp41	ACCTACCCCAACTCTGCCCTTCTCCCATCCAAGAGAAACCAGAAAATGATAAAGAAGCTAACCT	
Humeli	ACCTACCCCAACTCTGCCCTTCTCCCATCCAAGAGAAACCAGAAAATGATAAAGAAGCTAACCT	
EPB41	-----	
Klon13	-----	
Klon 9	-----	
Consensus		
	2861	2925
Humemp41	GCCATAGTCAGACTTCAGACTTTCAAGATTATTCTAAATCACCAGAAAATTAATTTTCAGTTTCTA	
Humeli	GCCATAGTCAGACTTCAGACTTTCAAGATTATTCTAAATCACCAGAAAATTAATTTTCAGTTTCTA	
EPB41	-----	
Klon13	-----	
Klon 9	-----	
Consensus		
	2926	2990
Humemp41	TTGGGAGTTTATACCAAGAGATTCTTCTAGATCTCATTGATCCTTTTGAAGAGCTTTTCTATAT	
Humeli	TTGGGAGTTTATACCAAGAGATTCTTCTAGATCTCATTGATCCTTTTGAAGAGCTTTTCTATAT	
EPB41	-----	
Klon13	-----	
Klon 9	-----	
Consensus		
	2991	3055
Humemp41	TAGGATATCAGAATTGTTCAACTTTTCACTCTATAGACTGTTTTAAGAGTTTTGGGGGGTTTTT	
Humeli	TAGGATATCAGAATTGTTCAACTTTTCACTCTATAGACTGTTTTAAGAGTTTTGGGGGGTTTTT	
EPB41	-----	
Klon13	-----	
Klon 9	-----	
Consensus		
	3056	3086
Humemp41	AATTGGGTGGTTTGTAAACCCCTTCAGCCTAG	
Humeli	AATTGGGTGGTTTGTAAACCCCTTCAGCCTAG	
EPB41	-----	
Klon13	-----	
Klon 9	-----	
Consensus		

- humemp41: Homo sapiens erythroid membrane protein 4.1 mRNA, complete cds.
Genbank accession number M61733
- humeli: Human erythroid isoform protein 4.1 mRNA, complete cds.
Genbank accession number J03796
- EPB41: Homo sapiens protein 4.1 (EPB4.1) mRNA, complete cds
Genbank accession number AF156225
- Klon 9: Gefundene neuronale Spleißform aus humanen cerebralen Gewebe
- Klon 13: Gefundene neuronale Spleißform aus humanen cerebralen Gewebe

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. T. G. Ohm und Herrn Prof. A. Elepfandt für die wissenschaftliche Betreuung und ihr Interesse am Fortgang der Untersuchung danken. Herrn Prof. T. G. Ohm danke ich für seine stetige Diskussionsbereitschaft sowie für die Freiheit, die er mir zur Verwirklichung eigener Konzepte und Ideen gewährte.

Herrn Dr. V. Meske, Herrn Dr. T. Jöns und Herrn Dr. O. Ninnemann danke ich für ihr Interesse an meiner Arbeit und ihre Diskussionsbereitschaft. Herrn Dr. T. Jöns möchte für die freundliche Gabe des Antiserums H9-85 danken.

Herrn Prof. J. Bohl und Herrn Prof. A. von Deimling danke ich für die Überlassung der humanen Gewebe, die für diese Studie verwendet wurden.

Frau R. Zarski danke ich für die Einführung in die verschiedenen immunhistochemischen Techniken.

Frau Dr. B. Schönheit danke ich für fachliche Beurteilung der immunhistochemischen Ergebnisse.

Allen ungenannten Mitarbeitern der Arbeitsgruppe danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre, die einen nicht unwesentlichen Beitrag zum Gelingen der Arbeit darstellte.

Lebenslauf

27.11.1967	Geboren in Gelnhausen
1988	Erreichen der Allgemeinen Hochschulreife
1988-1989	Ableisten des Grundwehrdienstes im 2. Fallschirmjägerbataillon 261; Lebach
1989-1996	Studium des Fachs Biologie Diplom an der Johann Wolfgang Goethe Universität; Frankfurt am Main
1996	Diplom in Biologie Diplomarbeit: Entwicklung neuer genetischer Marker im Genom der Kichererbse <i>Cicer arietinum</i> L.
1996	Promotion an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Humboldt Universität zu Berlin Anfertigung der vorliegenden Dissertation im Labor von Herrn Prof. T.G. Ohm

Eidestattliche Erklärung

Ich versichere an Eides statt, daß ich die vorliegende Dissertation ohne unerlaubte Hilfe angefertigt, das benutzte Schrifttum vollständig erwähnt habe, und daß die Dissertation noch von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist, oder eingereicht wurde.

Berlin, den 22.12. 2000